

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490416 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.07.11(22) Дата подачи заявки
2022.08.05(51) Int. Cl. A61K 35/17 (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07D 401/14 (2006.01)
C07D 417/14 (2006.01)
C07D 471/04 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ СЕЛЕКТИВНОЙ ДЕГРАДАЦИИ
СКОНСТРУИРОВАННЫХ БЕЛКОВ

(31) 63/230,225

(32) 2021.08.06

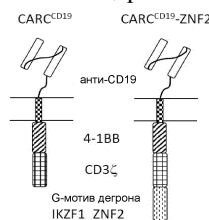
(33) US

(86) PCT/US2022/074589

(87) WO 2023/015283 2023.02.09

(71) Заявитель:
СЕЛДЖИН КОРПОРЕЙШН (US)(72) Изобретатель:
Кэрролл Кристофер Уолтон,
Д'Агостино Лаура Акуллиан, Лю
Хайбо, Шанмугасундарам Веерабаху,
Баракхас Брук (US)(74) Представитель:
Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина
Е.М., Угрюмов В.М., Строкова О.В.,
Костюшенкова М.Ю., Джермакян Р.В.
(RU)

(57) Настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам, содержащим домены деградации, соединениям, композициям и способам их получения и применения для деградации сконструированных белков в клетках. Домен деградации содержит последовательность FCX1X2CGX3X4, предпочтительно FCNQCGAS. Полипептид предпочтительно представляет собой CAR, содержащий такой домен деградации или дегрон, и подвергается деградации под действием агента деградации. Агент деградации представляет собой небольшую молекулу, которая связывает домен деградации, а также связывает цереброн.



A1

202490416

202490416

A1

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ СЕЛЕКТИВНОЙ ДЕГРАДАЦИИ СКОНСТРУИРОВАННЫХ БЕЛКОВ

1. ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 63/230,225, поданной 06 августа 2021, содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки во всех отношениях.

2. ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам, содержащим домены деградации, соединениям, композициям и способам их получения и применения для деградации сконструированных белков в клетках.

3. УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Для терапевтического применения были разработаны сконструированные клетки, содержащие сконструированный гетерологичный полипептид, такие как Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR-T). Модуляция уровней экспрессии таких сконструированных гетерологичных полипептидов может улучшить терапевтический эффект сконструированных клеток, например, путем уменьшения побочных эффектов и/или повышения эффективности сконструированных клеток.

[0004] Соответственно, в одном аспекте в настоящем документе представлены сконструированные полипептиды и агенты деградации, при этом сконструированные полипептиды содержат домен деградации, который опосредует убиквитинирование в клетке, когда домен деградации связывается с агентом деградации.

4. СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны соединения и их композиции для модуляции уровней экспрессии гетерологичного полипептида в клетке. В различных вариантах осуществления соединения и их композиции могут применяться для снижения уровня экспрессии гетерологичного полипептида в клетке.

[0006] Представленные варианты осуществления могут быть поняты более полно, исходя из подробного описания и примеров, которые предназначены для иллюстрации неограничивающих вариантов осуществления.

5. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0007] На Фиг. 1А показано выравнивание последовательностей белков IKZF1-IKZF5 семейства IKZF человека (SEQ ID NO: 48-52). На Фиг. 1В представлена таблица предполагаемых последовательностей «цинковых пальцев» IKZF1-IKZF5 человека, содержащих G-мотив. Последовательности G-мотива подчеркнуты.

[0008] На Фиг. 2 представлена схема химерного антигенного рецептора (CAR), содержащего С-концевой IKZF1 ZNF2 дегрон.

[0009] На Фиг. 3 представлена схема модельной системы на основе репортера клеток Jurkat для изучения активности и деградации CAR.

[00010] На Фиг. 4А-4С показано, что CAR, меченные IKZF1 ZNF2, сохраняют функцию (Фиг. 4А), но лишь частично подвергаются деградации под действием высоких концентраций Соединения А (Фиг. 4С). Структура Соединения А показана на Фиг. 4В.

[00011] На Фиг. 5А схематически показаны CAR, содержащие С-концевые IKZF1 ZNF1, 2 и/или 3 дегрона. Каждый из CAR также содержит N-концевой CD19-связывающий scFv. На Фиг. 5В показано, что CAR с С-концевыми IKZF1 дегронами сохраняют активность. На Фиг. 5С представлена деградация CAR с С-концевыми IKZF1 дегронами в присутствии возрастающих концентраций Соединения А. На Фиг. 5D показано, что деградация специфична для дегрона IKZF1 дикого типа.

[00012] На Фиг. 6А-6С показано снижение уровней CAR и ингибирование активности CAR после деградации в репортерной системе Jurkat.

[00013] На Фиг. 7 показано, что эндогенная передача сигналов Erk ослабляется деградацией CAR.

[00014] На Фиг. 8 показано выравнивание содержащего G-мотив «цинкового пальца» C2H2 некоторых членов семейства IKZF человека (SEQ ID NO: 21, 32, 27, 38, 40, 29, 47, 31, 23, 20, 26 и 37).

[00015] На Фиг. 9 показаны предсказанные дегроны цинковых пальцев C2H2 из различных белков человека (SEQ ID NO: 72-109).

[00016] На Фиг. 10А показана структура Соединения В. На Фиг. 10В показано убиквитинирование модифицированных G-мотивов из Ikaros ZNF2 с применением анализа убиквитинирования *in vitro*.

[00017] На Фиг. 11А показана структура Соединения С. На Фиг. 11В-11С показано, что деградация CAR, меченных IKZF1 ZNF2_3 Q1F дегроном, зависит от CRBN и убиквитин-протеасомного пути (UPP).

[00018] На Фиг. 12А-12В показано, что деградация CAR, меченного IKZF1 ZNF2_3 Q1F, снижает уровни CAR и передачу сигналов в репортерном анализе Jurkat.

[00019] На Фиг. 13А показана структура IKZF1 ZNF2_3 Q1F-меченных CAR. На Фиг. 13В показано, что экспрессия IKZF1 ZNF2_3 Q1F-меченных CAR титруется Соединением С в первичных Т-клетках.

[00020] На Фиг. 14А-14D показано, что функция IKZF1 ZNF2_3 Q1F-меченных CAR титруется Соединением С в первичных Т-клетках.

[00021] Фиг. 15 представляет собой схему анализа хронической антигенной стимуляции, применяемого для проверки функциональной персистенции.

[00022] На Фиг. 16А показана структура Соединения D. На Фиг. 16В-16С показаны временно находящиеся в покое CAR Т-клетки, которые в меньшей степени активируются хроническим воздействием антигена и сохраняют более наивный фенотип.

[00023] На Фиг. 17А-17В показано, что временно находящиеся в покое CAR Т-клетки продуцируют больше провоспалительных цитокинов и демонстрируют лучшую противоопухолевую активность после хронического воздействия антигена, чем клетки без отдыха.

[00024] На Фиг. 18А-18С показано, что количество CAR, меченного Q1F дегроном, может быть обратимо снижено *in vivo*.

[00025] На Фиг. 19А-19D показано, что даун-регулирование CAR, меченного Q1F дегроном, снижает ответную экспансию опухоли *in vivo*.

[00026] На Фиг. 20А-20D показан нокин с применением метки дегрона в рамке считывания эндогенного локуса AURKA или TOX, что обеспечивает опосредованный соединением контроль уровней белка.

6. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[00027] В контексте настоящего документа термины «содержащий» и «включающий в себя» могут применяться как взаимозаменяемые. Термины «содержащий» и «включающий в себя» следует интерпретировать как определяющие наличие раскрытых отличительных признаков или компонентов, о которых идет речь, но не исключают наличия или добавления одного или более их отличительных признаков, или компонентов, или групп. Кроме того, термины «содержащий» и «включающий в себя» предназначены для включения примеров, охватываемых термином «состоящий из». Следовательно, термин «состоящий из» может применяться вместо терминов «содержащий» и «включающий в себя» для предоставления более конкретных вариантов осуществления данного изобретения.

[00028] Термин «состоящий из» означает, что объект изобретения имеет, по меньшей мере, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% заявленных отличительных признаков или

компонентов, из которых он состоит. В другом варианте осуществления термин «состоящий из» исключает из объема любого последующего перечисления любые другие отличительные признаки или компоненты, за исключением тех, которые не являются существенными для достижения технического эффекта.

[00029] В контексте настоящего документа термин «или» следует интерпретировать как включающий «или», означающий любую одну или любую комбинацию. Следовательно, «А, В или С» означает любое из следующего: «А; В; С; А и В; А и С; В и С; А, В и С». Исключение из этого определения будет иметь место только тогда, когда комбинация элементов, функций, стадий или действий в некотором роде по своей сути является взаимоисключающей.

[00030] В настоящем описании любой диапазон концентраций, диапазон процентного содержания, диапазон соотношений или диапазон целых чисел следует понимать как включающий значение любого целого числа в пределах указанного диапазона и, при необходимости, его доли (например, одну десятую и одну сотую часть целого числа), если не указано иное. Кроме того, следует понимать, что любой диапазон чисел, указанный здесь, относящийся к любому физическому признаку, такому как субъединицы полимера, размер или толщина, включает любое целое число в пределах указанного диапазона, если не указано иное. В контексте настоящего документа термины «около» и «приблизительно» означают $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ или $\pm 1\%$ от указанного диапазона, значения или структуры, если не указано иное.

[00031] В контексте настоящего документа «сконструированный полипептид» представляет собой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая не встречается в природе. Хотя части сконструированного полипептида могут встречаться в природе, сконструированный полипептид в целом не встречается. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид содержит встречающуюся в природе аминокислотную последовательность, которая была модифицирована, например, путем ее слияния с доменом деградации или вставки в него. В некоторых таких вариантах осуществления полученный в результате сконструированный полипептид по существу сохраняет активность исходного полипептида природного происхождения. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид содержит два или более, или три или более, или четыре или более доменов, полученных из двух или более, или трех или более, или четырех или более встречающихся в природе полипептидов. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид содержит домен деградации.

[00032] В контексте настоящего документа термины «дегрон» и «домен деградации» применяются взаимозаменяемо и означают аминокислотную последовательность, которая,

в тех случаях, когда присутствует в полипептиде в клетке, приводит к убиквитинированию полипептида убиквитинлигазой в присутствии соединения, которое связывается как с доменом деградации, так и с убиквитинлигазой. В некоторых вариантах осуществления соединение связывается с доменом деградации и с церебллоном. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид содержит домен деградации. После убиквитинирования убиквитинлигазой полипептид, содержащий домен деградации, может подвергаться деградации.

Иллюстративные сконструированные полипептиды

[00033] В настоящем документе представлены сконструированные полипептиды, содержащие домен деградации. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид представляет собой CAR. В некоторых вариантах осуществления такие полипептиды содержат трансмембранный домен, внеклеточный домен и внутриклеточный домен. В некоторых таких вариантах осуществления домен деградации расположен во внутриклеточном домене сконструированного полипептида. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен содержит лиганд, лиганд-связывающий домен или антигенсвязывающий домен. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен связывает раковый антиген. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит переменную область легкой или тяжелой цепи антитела или scFv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит антигенсвязывающий домен однодоменного антитела. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен содержит, по меньшей мере, один костимулирующий домен. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен содержит, по меньшей мере, один сигнальный домен, такой как сигнальный домен ITAM. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид представляет собой CAR, содержащий домен деградации, как дополнительно описано ниже.

[00034] В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид основан на встречающемся в природе белке, в который домен деградации был встроен с помощью генной инженерии или с которым домен деградации был слит. Полученный в результате сконструированный полипептид может содержать дополнительную аминокислотную последовательность природного или не природного происхождения. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид основан на встречающемся в природе ядерном или цитоплазматическом белке. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид по существу сохраняет активность

природного белка. Деграция сконструированного полипептида может быть осуществлена путем приведения в контакт с клеткой, которая экспрессирует сконструированный полипептид, например, путем введения агента деграции. В некоторых таких вариантах осуществления домен деграции получен из аминокислотной последовательности цинкового пальца семейства Ikaros (ZNF), и агент деграции представляет собой небольшую молекулу, которая связывается с убиквитинлигазой, такой как лигаза E3. Введение агента деграции в клетки, экспрессирующие сконструированный полипептид, содержащий домен деграции, приводит к убиквитинированию сконструированного полипептида, содержащего домен деграции, с помощью лигазы E3 и деграции сконструированного полипептида. В некоторых вариантах осуществления агент деграции представляет собой соединение, которое связывает цереблон и домен деграции.

[00035] В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид содержит природный белок и домен деграции, слитый с природным белком или встроенный в него. Когда домен деграции «слит с» белком, сконструированный полипептид может содержать линкер, связывающий домен деграции с белком, такой как аминокислотный линкер. Такие аминокислотные линкеры могут иметь любую длину и, например, состоять из 1-50, 1-40, 1-30, 1-20, 1-10 или 1-5 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные линкеры состоят из глицина и серина.

[00036] Неограничивающие иллюстративные белки, с которыми домен деграции может быть слит или в которые домен деграции может быть встроен, включают PRDM1, TGFBR2, CASP8, CBLB, CD5, CISH, CGKA, DGKz, MAP4K1, ARID2, BACH2, CHX37, KLF2, KLF3, KLF6, MAF, SIGLEC9, TOX, ZBTB32, PTPN2, AKT1, PIK3CD, MT1E, MT2A, CSK, ITK, PAG1, PDCD4, ZC3H12A, DNMT1, DNMT3A, PRBM1, STK4, TET2, BNIP3, FAS, CBL, BGAT5, RNF128, STK17B, TRIB1, TXNIP, UBASH3A, BATF, FLI1, IKZF1, IKZF2, IRF4, NFATC1, NR4A1, MAP2K1, MAP2K2, MAP4K4, PPARGC1A, RELB, TMEM173, USP10, MT1A, члены семейства PP2A, RASA2, NR4A2, NR4A3, AHR, CD70, LHALS1, SOCS1, SOCS2, SOCS3, TAZ, USP21 или YAP1. В некоторых вариантах осуществления белок представляет собой белок млекопитающих, такой как белок человека.

[00037] В некоторых вариантах осуществления домен деграции слит с эндогенным белком в клетке или встроен в него. В некоторых таких вариантах осуществления последовательность, кодирующая домен деграции, может быть встроена в геном клетки, которая экспрессирует эндогенный белок, таким образом, что экспрессируется сконструированный полипептид, содержащий домен деграции, слитый с эндогенным белком или встроенный в него. В данной области техники известны различные способы

встраивания последовательности нуклеиновой кислоты, такой как последовательность, кодирующая домен деградации, в геном клетки, включая, например, опосредованный аденоассоциированным вирусом (AAV) или невирусную гомологично направленную рекомбинацию посредством CRISPR/Cas, лентивирусную трансдукцию или доставку с помощью транспозонов. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая домен деградации, слита с эндогенным белком иммунной клетки, такой как Т-лимфоцит, или встроена в него. В некоторых таких вариантах осуществления Т-клетки выделяют, конструируют для экспрессии сконструированного полипептида и вводят пациенту. После введения пациенту может быть последовательно введен агент деградации, если деградация сконструированного полипептида является желательной.

[00038] В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сконструированный полипептид, вводят в клетку. Способы введения нуклеиновых кислот в клетки известны в данной области техники и включают синтетические векторы, лентивирусные или ретровирусные векторы, автономно реплицирующиеся плазмиды, вирус (например, ретровирус, лентивирус, аденовирус или вирус герпеса) и тому подобное, содержащие нуклеиновую кислоту (полинуклеотиды), кодирующие сконструированные полипептиды, описанные в настоящем документе.

Иллюстративные домены деградации

[00039] Сконструированные полипептиды, представленные в настоящем документе, содержат домен деградации. В некоторых вариантах осуществления домен деградации содержит аминокислотную последовательность, которая связывается с агентом деградации. Агент деградации связывается с доменом деградации и с убиквитинлигазой, что приводит к убиквитинированию сконструированного полипептида.

[00040] В некоторых вариантах осуществления домен деградации содержит аминокислотную последовательность, полученную из G-мотива белка семейства Ikaros, такого как Ikaros, Helios, Aiolos, Eos или Pegasus. Неограничивающие иллюстративные G-мотивы подчеркнуты в последовательностях, показанных на Фиг. 1В. Домен деградации, представленный в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления содержит аминокислотную последовательность, которая модифицирована из нативной последовательности G-мотива путем замены аминокислоты в первом положении на фенилаланин (F). В некоторых вариантах осуществления домен деградации получен из G-мотива, который в естественных условиях содержит Q в первом положении, таким образом домен деградации содержит замену Q1F.

[00041] В некоторых вариантах осуществления домен деградации содержит аминокислотную последовательность FCX₁X₂CGX₃X₄ (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления X₁ выбран из аспарагина, аспартата, глицина, глутамина, метионина, гистидина, триптофана, изолейцина, аргинина, лейцина, валина, треонина и фенилаланина; X₂ выбран из глутамина, аргинина, гистидина, лейцина, фенилаланина, тирозина, триптофана, изолейцина, валина и метионина; X₃ выбран из аланина, серина, цистеина, аргинина, лейцина, изолейцина, метионина и глицина; и X₄ выбран из серина, метионина, лизина, изолейцина, валина, гистидина, глутамина, аргинина, фенилаланина и триптофана. В некоторых вариантах осуществления X₁ выбран из аспарагина, глутамина, метионина, гистидина, триптофана, изолейцина, аргинина, лейцина, валина, треонина и фенилаланина. В некоторых вариантах осуществления X₂ выбран из глутамина, аргинина, гистидина, лейцина, фенилаланина, тирозина, триптофана, изолейцина и метионина. В некоторых вариантах осуществления X₃ выбран из аланина, серина, цистеина и глицина. В некоторых вариантах осуществления X₄ выбран из серина, метионина, гистидина, глутамина, аргинина, фенилаланина и триптофана. В некоторых вариантах осуществления X₁ представляет собой аспарагин. В некоторых вариантах осуществления X₂ представляет собой глутамин. В некоторых вариантах осуществления X₃ представляет собой аланин или серин. В некоторых вариантах осуществления X₃ представляет собой аланин. В некоторых вариантах осуществления X₄ представляет собой серин. В некоторых вариантах осуществления домен деградации сконструированного полипептида содержит аминокислотную последовательность FCNQCGAS (SEQ ID NO: 3).

[00042] В некоторых вариантах осуществления домен деградации содержит аминокислотную последовательность FCX₁X₂CGX₃X₄X₅ (SEQ ID NO: 2), где X₁, X₂, X₃ и X₄ имеют значения, определенные выше. В некоторых вариантах осуществления X₅ выбран из фенилаланина, триптофана, метионина, аргинина, гистидина, лейцина, тирозина, цистеина и глутамина. В некоторых вариантах осуществления X₅ выбран из фенилаланина, триптофана, метионина, аргинина, гистидина, лейцина, тирозина и глутамина. В некоторых вариантах осуществления X₅ выбран из фенилаланина, триптофана, метионина, лейцина, тирозина и глутамина. В некоторых вариантах осуществления X₅ представляет собой фенилаланин.

[00043] В различных вариантах осуществления домен деградации содержит, по меньшей мере, один домен типа «цинковые пальцы», который содержит модифицированный G-мотив, описанный выше. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один домен типа «цинковые пальцы» получен из белка семейства Ikaros, такого как Ikaros, Helios, Aiolos, Eos или Pegasus. Неограничивающие иллюстративные

примеры цинковых пальцев, содержащих G-мотивы, показаны на Фиг. 1В. В различных вариантах осуществления домен деградации содержит один, два, три или четыре домена типа «цинковые пальцы». В некоторых вариантах осуществления домен деградации содержит один домен типа «цинковые пальцы», который содержит G-мотив, и, по меньшей мере, один домен типа «цинковые пальцы», который не содержит G-мотив. Домены типа «цинковые пальцы» могут или не могут быть образованы из одного и того же белка. В некоторых вариантах осуществления домен деградации содержит два домена типа «цинковые пальцы».

[00044] В некоторых вариантах осуществления домен деградации содержит аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90% или, по меньшей мере, на 95% идентична цинковому пальцу 2 (ZNF2) Ikaros человека. В некоторых вариантах осуществления домен деградации содержит аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90% или, по меньшей мере, на 95% идентична цинковому пальцу 2 (ZNF2) Ikaros человека, и, по меньшей мере, один дополнительный домен типа «цинковые пальцы», такой как, по меньшей мере, один дополнительный домен типа «цинковые пальцы» белка семейства Ikaros. В некоторых вариантах осуществления домен деградации содержит аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90% или, по меньшей мере, на 95% идентична цинковому пальцу 2 (ZNF2) Ikaros человека и ZNF1 или ZNF3 Ikaros человека. В некоторых вариантах осуществления домен деградации содержит аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90% или, по меньшей мере, на 95% идентична цинковому пальцу 2 (ZNF2) и цинковому пальцу 3 (ZNF3) Ikaros человека.

[00045] В некоторых вариантах осуществления домен деградации содержит аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90% или, по меньшей мере, на 95% идентична аминокислотам 145-167 Ikaros человека (FQCNQCGASFTQKGNLLRHIKLN; SEQ ID NO: 21). В некоторых вариантах осуществления домен деградации содержит аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90% или, по меньшей мере, на 95% идентична аминокислотам 140-162 Helios человека (FHCNQCGASFTQKGNLLRHIKLN; SEQ ID NO: 27). В некоторых вариантах осуществления домен деградации содержит аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90% или, по меньшей мере, на 95% идентична аминокислотам 146-168 Aiolos человека (FQCNQCGASFTQKGNLLRHIKLN; SEQ ID NO: 32). В некоторых вариантах осуществления домен деградации содержит аминокислотную последовательность,

которая, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90% или, по меньшей мере, на 95% идентична аминокислотам 187-209 Eos человека (FHCNQC GASFTQKGNLLRHIKLN; SEQ ID NO: 38).

[00046] В некоторых вариантах осуществления домен деградации содержит аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90% или, по меньшей мере, на 95% идентична аминокислотам 141-168 Ikaros человека (GERPFQCNQC GASFTQKGNLLRHIKLS; SEQ ID NO: 15). В некоторых вариантах осуществления домен деградации содержит аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90% или, по меньшей мере, на 95% идентична аминокислотам 136-163 Helios человека (GERPFHCNQC GASFTQKGNLLRHIKLS; SEQ ID NO: 60). В некоторых вариантах осуществления домен деградации содержит аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90% или, по меньшей мере, на 95% идентична аминокислотам 142-169 Aiolos человека (GERPFQCNQC GASFTQKGNLLRHIKLHT; SEQ ID NO: 61). В некоторых вариантах осуществления домен деградации содержит аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90% или, по меньшей мере, на 95% идентична аминокислотам 183-210 Eos человека (GERPFHCNQC GASFTQKGNLLRHIKLS; SEQ ID NO: 62).

[00047] В некоторых вариантах осуществления домен деградации содержит аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90% или, по меньшей мере, на 95% идентична аминокислотам 141-196 Ikaros человека (GERPFQCNQC GASFTQKGNL LRHIKLSHSGE KPFKCHLCNY ACRRRDALTG HLRTHS; SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах осуществления домен деградации содержит аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90% или, по меньшей мере, на 95% идентична аминокислотам 136-191 Helios человека (GERPFHCNQC GASFTQKGNL LRHIKLSHSGE KPFKCPFCSY ACRRRDALTG HLRTHS; SEQ ID NO: 63). В некоторых вариантах осуществления домен деградации содержит аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90% или, по меньшей мере, на 95% идентична аминокислотам 142-197 Aiolos человека (GERPFQCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHTGE KPFKCHLCNY ACRRRDALTG HLRTHS; SEQ ID NO: 64). В некоторых вариантах осуществления домен деградации содержит аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90% или, по меньшей мере, на 95% идентична аминокислотам

183-238 Eos человека (GERPFHCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCPFCNY ACRRRDALTGHLRTHS; SEQ ID NO: 65).

[00048] В некоторых вариантах осуществления домен деградации содержит аминокислотную последовательность:

GERPFFCX₁X₂CGX₃X₄X₅TQKGNLLRHIKLHSGEKPFKCHLCNYACRRRDALTGHLRTHS (SEQ ID NO: 5), где X₁, X₂, X₃, X₄ и X₅ являются такими, как определено выше. В некоторых вариантах осуществления домен деградации содержит аминокислотную последовательность:

GERPFFCX₁X₂CGX₃X₄X₅TQKGNLLRHIKLHSGEKPFKCPFCNYACRRRDALTGHLRTHS (SEQ ID NO: 66), где X₁, X₂, X₃, X₄ и X₅ являются такими, как определено выше. В некоторых вариантах осуществления домен деградации содержит аминокислотную последовательность:

GERPFFCX₁X₂CGX₃X₄X₅TQKGNLLRHIKLHTGEKPFKCHLCNYACQRRDALTGHLRTHS (SEQ ID NO: 67), где X₁, X₂, X₃, X₄ и X₅ являются такими, как определено выше. В некоторых вариантах осуществления домен деградации содержит аминокислотную последовательность:

GERPFFCX₁X₂CGX₃X₄X₅TQKGNLLRHIKLHSGEKPFKCPFCNYACRRRDALTGHLRTHS (SEQ ID NO: 68), где X₁, X₂, X₃, X₄ и X₅ являются такими, как определено выше.

[00049] В некоторых вариантах осуществления домен деградации содержит аминокислотную последовательность:

GERPFFCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHSGEKPFKCHLCNYACRRRDALTGHLRTHS

(SEQ ID NO: 7). В некоторых вариантах осуществления домен деградации содержит аминокислотную последовательность:

GERPFFCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHSGEKPFKCPFCNYACRRRDALTGHLRTHS (SEQ ID NO: 69). В некоторых вариантах осуществления домен деградации содержит аминокислотную последовательность:

GERPFFCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHTGEKPFKCHLCNYACQRRDALTGHLRTHS

(SEQ ID NO: 70). В некоторых вариантах осуществления домен деградации содержит аминокислотную последовательность:

GERPFFCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHSGEKPFKCPFCNYACRRRDALTGHLRTHS

(SEQ ID NO: 71).

Иллюстративные конструкции химерных антигенных рецепторов

[00050] Возможность модулировать экспрессию CAR путем их деградации в присутствии агента деградации имеет множество преимуществ по сравнению с

отсутствием возможности модулировать экспрессию CAR. Например, целевые, но внеопухолевые эффекты, опосредованные терапевтическими иммунными клетками, экспрессирующими CAR, которые потенциально приводят к токсичности, могут быть уменьшены или устранены путем деградации CAR. Слишком сильный иммунный ответ, опосредованный CAR, может быть уменьшен или устранен путем деградации CAR. Дисфункции Т-клеток, вызванной хронической активацией и сверхэкспрессией контрольных точек, можно избежать путем циклирования экспрессии CAR и/или титрования экспрессии CAR. Такая деградация CAR осуществляется здесь путем экспрессии CAR, который содержит домен деградации, представленный здесь, и введения агента деградации, при необходимости. В некоторых таких вариантах осуществления агент деградации представляет собой малую молекулу, которая связывается с убиквитинлигазой, такой как лигаза E3. Введение агента деградации в клетки, экспрессирующие полипептид CAR, содержащий домен деградации, приводит к убиквитинированию полипептида CAR, содержащего домен деградации, с помощью лигазы E3 и деградации полипептида CAR. В некоторых вариантах осуществления агент деградации представляет собой соединение, которое связывает цереблон и домен деградации.

[00051] В настоящем документе представлены сконструированные полипептиды, содержащие или состоящие из химерных антигенных рецепторов (CAR), содержащих (a) компоненты CAR, такие как антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, клеточный сигнальный домен и/или костимулирующий домен, и (b) домен деградации. Когда CAR, слитый с доменом деградации, экспрессируется в иммунной клетке (например, в Т-лимфоците или естественной клетке-киллере) в присутствии агента деградации, такого как соединение, связывающее цереблон, лигазы E3, такой как цереблон, и домен деградации в CAR связывает агент деградации, что приводит к образованию комплекса лигазы E3, который убиквитинирует домен деградации. Таким образом, активность CAR, описанных в настоящем документе (например, активность *in vivo*), можно контролировать путем приведения в контакт клетки, экспрессирующей CAR, содержащей домен деградации (например, Т-лимфоциты, сконструированные для экспрессии указанных полипептидов CAR), с агентом деградации, таким как соединение, связывающее цереблон.

[00052] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен сконструированный полипептид, который представляет собой CAR, содержащий антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, внутриклеточный первичный сигнальный домен и домен деградации. В некоторых вариантах осуществления домен деградации содержит аминокислотную последовательность, представленную в настоящем документе.

[00053] В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид представляет собой CAR, содержащий в порядке от аминоконца к карбоксильному концу антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, первичный T-клеточный сигнальный домен и/или костимулирующий домен и домен деградации. В некоторых вариантах осуществления домен деградации расположен на C-конце CAR. В некоторых вариантах осуществления домен деградации содержит аминокислотную последовательность, представленную в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит костимулирующий домен.

[00054] В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид представляет собой CAR, содержащий в порядке от аминоконца к карбоксильному концу (i) внеклеточный домен [ECD] - трансмембранный домен [TM] - костимулирующий домен [CoD] - сигнальный домен [SigD] - домен деградации [DD]. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид представляет собой CAR, содержащий в порядке от аминоконца к карбоксильному концу ECD-TM-CoD-DD-SigD. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид представляет собой CAR, содержащий в порядке от аминоконца к карбоксильному концу ECD-TM-DD-CoD-SigD. Домены деградации также могут быть вставлены в другой домен, например, в костимулирующий домен или в сигнальный домен, предпочтительно таким образом, чтобы сохранялась целевая активность доменов.

Иллюстративные антигенсвязывающие домены

[00055] Антигенсвязывающие домены CAR, представленные в настоящем документе, могут представлять собой любой полипептидный домен, мотив или последовательность, которая связывается с антигеном.

[00056] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен CAR, описанных в настоящем документе, представляет собой антигенсвязывающую часть рецептора. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен CAR, описанных в настоящем документе, представляет собой рецептор для лиганда, продуцируемого опухолевой клеткой.

[00057] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен CAR, описанных в настоящем документе, представляет собой антигенсвязывающую часть антитела. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен CAR, описанных в настоящем документе, представляет собой антитело, антитело, содержащее цепь, одноцепочечное антитело или его антигенсвязывающую часть, домен Fc, якорный домен гликофосфатидилинозитола или фрагмент антитела scFv.

[00058] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен CAR, описанных в настоящем документе, представляет собой макромолекулярный антигенсвязывающий агент на основе пептида, например, белок фагового дисплея.

[00059] В некоторых вариантах осуществления связывание антигена с помощью антигенсвязывающего домена CAR, описанного в настоящем документе, ограничивается презентацией антигена в ассоциации с главными комплексами гистосовместимости (МНС). В некоторых вариантах осуществления связывание антигена с помощью антигенсвязывающего домена CAR, описанного в настоящем документе, не ограничено МНС.

[00060] Антиген, связывающийся/распознаваемый антигенсвязывающим доменом CAR, описанных в настоящем документе, может представлять собой любой представляющий интерес антиген. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой антиген, который экспрессируется на поверхности клетки (например, опухолевой клетки, такой как клетка солидной опухоли или опухолевая клетка рака крови).

[00061] В некоторых вариантах осуществления антиген, связывающийся/распознаваемый антигенсвязывающим доменом CAR, описанных в настоящем документе, представляет собой антиген, продуцируемый опухолевой клеткой, например, антиген представляет собой опухолевый специфический антиген (TSA) или опухолеассоциированный антиген (TAA). Иллюстративные антигены опухолевых клеток, которые могут распознаваться CAR, описанными в настоящем документе (то есть, связанные антигенсвязывающим доменом CAR), включают, без ограничения, 4-1BB, 5T4, 8H9, B7-H6, антиген аденокарциномы, α -фетопроtein, антиген созревания В-клеток (BCMA), BAFFR, В-клеточной лимфомы, антиген C242, CA9, карциноэмбриональный антиген, CA-125, карбоангидразу 9 (CA-IX), CCR4, CD3, CD4, CD19, CD20, CD22, CD23 (IgE рецептор), CD28, CD30 (T FRSF8), CD33, CD38, CD40, CD44v6, CD44v7/8, CD51, CD52, CD56, CD70 CD74, CD80, CD123, CD152, CD171, CD200, CD221, CE7, CEA, C-MET, CLAUDIN6, CLAUDIN18,3, CNT0888, CTLA-4, DRS, EpCAM, ErbB2, ErbB3/4, EGFR, EGFR γ III, EphA2, EGP2, EGP40, FAP, фетальный AchR, дополнительный домен В фибронектина, фолатный рецептор α , фолатный рецептор 1, G250/CAIX, GD2, GD3, гликопротеин 75, GP MB, HER2/neu, HGF, HLA-A1 MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, HMW-MAA, рецепторную киназу фактора роста гепатоцитов человека, рецептор IGF-1, IGF-I, IgG1, IL-6, IL-13, рецептор IL-13 α 2, рецептор IL-11 α , рецептор инсулиноподобного фактора роста I, интегрин α 5 β 1, интегрин α v β 3, легкую каппа-цепь, L1-CAM, легкую лямбда-цепь, антиген Leu, мезотелин, MORAb-009, MS4A1, MUC1, MUC1 6, муцин CanAg, NCAM, N-гликолилнейраминую кислоту, лиганды NKG2D, NPC-IC, PDGF-R α , PDL192,

фосфатидилсерин, простатспецифический раковый антиген (PSCA), клетки карциномы предстательной железы, PSMA, PSC1, RANKL, RON, ROR1, SCH 900105, SDC1, SLAMF7, spl7, TAG72, тенаascin C, TGF β 2, TGF- β 3, TL1A, TRAIL-R1, TRAIL-R2, опухолевый антиген СТАА16.88, UPK1B, VEGF-A, рецепторы VEGF, VEGFR-1, VEGFR2, TEM1, TEM8 и/или виментин.

[00062] В некоторых вариантах осуществления антиген, связывающийся/распознаваемый антигенсвязывающим доменом CAR, описанных в настоящем документе, представляет собой антиген, экспрессируемый или ассоциированный с опухолевой клеткой лимфомы/лейкемии, рака легких, рака молочной железы, рака простаты, аденокарциномы, карциномы щитовидной железы, карциномы носоглотки, меланомы, например, злокачественной меланомы, карциномы кожи, колоректальной карциномы, десмоидной опухоли, десмопластической мелкокруглоклеточной опухоли, эндокринной опухоли, саркомы Юинга, периферической примитивной нейроэктодермальной опухоли, солидной герминогенной опухоли, гепатобластомы, нейробластомы, рабдомиосаркомоподобной саркомы мягких тканей, остеосаркомы, ретинобластомы, рабдомиосаркомы, опухоли Вильмса, глиобластомы, миксомы, фибромы, липомы или тому подобное.

[00063] В некоторых вариантах осуществления антиген, связывающийся/распознаваемый антигенсвязывающим доменом CAR, описанных в настоящем документе, представляет собой антиген, экспрессируемый или ассоциированный с опухолевой клеткой хронического лимфоцитарного лейкоза (мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы), В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, лимфоцитомы лимфомы, макроглобулинемии Вальденстрема, лимфомы маргинальной зоны селезенки, плазмноклеточной миеломы, плазмцитомы, экстранодальной В-клеточной лимфомы из клеток маргинальной зоны, лимфомы MALT-типа, узловой В-клеточной лимфомы из клеток маргинальной зоны, фолликулярной лимфомы, мантийноклеточной лимфомы, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, медиастиальной (тимической) крупноклеточной В-клеточной лимфомы, внутрисосудистой крупноклеточной В-клеточной лимфомы, первичной выпотной лимфомы, лимфомы Беркитта, Т-лимфоцитарного пролимфоцитарного лейкоза, Т-лимфоцитарного лейкоза из больших гранулярных лимфоцитов, агрессивного НК-клеточного лейкоза, Т-клеточной лейкемии/лимфомы взрослых, экстранодальной НК/Т-клеточной лимфомы назального типа, Т-клеточной лимфомы энтеропатического типа, Т-клеточной лимфомы печени и селезенки, бластной НК-клеточной лимфомы, грибовидного микоза, синдрома Сезари, первичной кожной анапластической крупноклеточной лимфомы,

лимфоматоидного папулеза, ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы, периферической Т-лимфоцитарной лимфомы (неуточненной), анапластической крупноклеточной лимфомы, лимфомы Ходжкина или неходжкинской лимфомы.

[00064] В некоторых вариантах осуществления антиген, связывающийся/распознаваемый антигенсвязывающим доменом CAR, описанных в настоящем документе, представляет собой неопухолеассоциированный антиген или неопухолеспецифичный антиген. В некоторых вариантах осуществления антиген относится к одному из аспектов опухоли, например, к среде опухоли. Например, опухоль может вызывать воспалительное состояние в ткани, окружающей опухоль, и может высвобождать ангиогенные факторы роста, интерлейкины и/или цитокины, которые способствуют ангиогенезу внутри и на периферии опухоли. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой фактор роста, цитокин или интерлейкин (например, фактор роста, цитокин или интерлейкин, ассоциированный с ангиогенезом или васкулогенезом). Такие факторы роста, цитокины и интерлейкины могут включать, без ограничения, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), основной фактор роста фибробластов (bFGF), фактор роста тромбоцитов (PDGF), фактор роста гепатоцитов (HGF), инсулиноподобный фактор роста (IGF) и интерлейкин-8 (IL-8).

[00065] В некоторых вариантах осуществления антиген, связывающийся/распознаваемый антигенсвязывающим доменом CAR, описанных в настоящем документе, представляет собой молекулу молекулярного паттерна, ассоциированного с повреждением (DAMP; также известного как алармин), высвобождаемую здоровой тканью в ответ на локализованное повреждение, вызванное опухолью. Иллюстративные DAMP, с которыми может связываться антигенсвязывающий домен CAR, описанных в настоящем документе, включают, без ограничения, белок теплового шока, ассоциированный с хроматином белок 1 высокомобильной группы (HMGB1), S100A8 (MRP8, кальгранулин А), S100A9 (MRP14, кальгранулин В), сывороточный амилоид А (SAA), дезоксирибонуклеиновую кислоту, аденозинтрифосфат, мочевую кислоту и сульфат гепарина.

Иллюстративные трансмембранные домены

[00066] В контексте настоящего документа термин «трансмембранный домен» включает транзитные трансмембранные домены, в которых полипептид, содержащий трансмембранный домен, содержит как внутриклеточные, так и внеклеточные домены, и заякоренные на мембране домены, в которых полипептид, содержащий трансмембранный домен, содержит внутриклеточный домен, но не содержит внеклеточный домен.

[00067] Трансмембранные домены сконструированных полипептидов, описанных в настоящем документе, могут содержать любую молекулу, известную в данной области техники, которая функционирует как трансмембранный домен, например, известный специалисту в данной области техники, функционирующий в контексте, в котором он будет применяться, например, в CAR. Сконструированные полипептиды с трансмембранными доменами, описанные в настоящем документе, могут быть получены или разработаны на основе трансмембранного домена любого трансмембранного белка и могут включать весь или часть такого трансмембранного домена.

[00068] В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен сконструированного полипептида, описанного в настоящем документе, такого как CAR, получен или разработан на основе Т-клеточного рецептора, например, трансмембранный домен сконструированного полипептида, описанного в настоящем документе, получен или разработан на основе альфа-цепи Т-клеточного рецептора, бета-цепи Т-клеточного рецептора, дзета-цепи Т-клеточного рецептора.

[00069] В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен сконструированного полипептида, описанного в настоящем документе, получен или разработан на основе CD28, CD3s, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, ICOS, TIM3, LAB3, TIGIT, PD1 или CTLA4, цитокинового рецептора, рецептора интерлейкина или рецептора фактора роста.

Иллюстративные сигнальные домены

[00070] Первичный клеточный сигнальный домен CAR, описанных в настоящем документе, может содержать любую молекулу, известную в данной области техники, которая функционирует как клеточный сигнальный домен, например, известный специалисту в данной области техники как функционирующий в контексте CAR. В некоторых вариантах осуществления клеточный сигнальный домен CAR, описанных в настоящем документе, содержит первичный Т-клеточный сигнальный домен.

[00071] В некоторых вариантах осуществления первичный клеточный сигнальный домен CAR, описанных в настоящем документе, представляет собой или содержит ZAP-70 или его вариант трансдукции сигнала.

[00072] В некоторых вариантах осуществления первичный клеточный сигнальный домен CAR, описанных в настоящем документе, представляет собой или содержит ITAM. В некоторых вариантах осуществления указанный ITAM представляет собой ITAM CD3 ϵ , CD3 ζ , CD3 η , FcR γ , FcR β , CD3 δ , CD3 γ , CD5, CD22, CD20, CD79a, CD79b, CD278 (ICOS), FcERI, CD66d, DAP10 или DAP12.

Иллюстративные костимулирующие домены

[00073] В некоторых вариантах осуществления CAR, описанные в настоящем документе, содержат костимулирующий домен. Костимулирующий домен(ы) CAR, описанных в настоящем документе, может содержать любую молекулу, известную в данной области техники, которая функционирует как костимулирующий домен, например, известный специалисту в данной области техники как функционирующий в контексте CAR.

[00074] В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен CAR, описанных в настоящем документе, получен или разработан на основе костимулирующей полипептидной последовательности CD27, костимулирующей полипептидной последовательности CD28, костимулирующей полипептидной последовательности OX40 (CD134), костимулирующей полипептидной последовательности 4-1BB (CD137) или индуцируемой Т-клеточной костимулирующей полипептидной последовательности (ICOS).

[00075] В некоторых вариантах костимулирующий домен CAR, описанных в настоящем документе, представляет собой или содержит 4-1BB (CD137), CD28, OX40, активирующий рецептор К-клеток, BTLA, лиганд Toll-подобного рецептора, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, CDS, ICAM-L LFA-1 (CD1 la/CD18), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), RANK, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, Kp80 (KLRF1), Kp44, Kp30, Kp46, CD 19, CD4, CD8a, CD8p, IL2Rp, IL2Ry, IL7Ra, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD1 ld, ITGAE, CD103, ITGAL, CD1 la, LFA-1, ITGAM, CD1 lb, ITGAX, CD1 lc, ITGB 1, CD29, ITGB2, IL15Ra, IL7R, CD18, CD132, LFA-1, ITGB7, KG2D, KG2C, T FR2, TRANCE/RA KL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD 160 (BY55), PSGL1, CD 100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD 150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD 162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, DAP10, DAP 12, лиганд CD83, молекулу МНС класса I, белок рецептора TNF, иммуноглобулинподобный белок, рецептор цитокина, интегрин и/или сигнальную молекулу активации лимфоцитов.

Другие иллюстративные компоненты

[00076] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды, такие как CAR, описанные в настоящем документе, дополнительно содержат мотив выживания Т-клеток. Мотив выживания Т-клеток может представлять собой любую

аминокислотную последовательность или мотив, который способствует выживанию Т-лимфоцита после стимуляции антигеном. В некоторых вариантах осуществления мотив выживания Т-клеток представляет собой или получен из CD3, CD28, внутриклеточного сигнального домена рецептора IL-7 (IL-7R), внутриклеточного сигнального домена рецептора IL-12, внутриклеточного сигнального домена рецептора IL-15, внутриклеточного сигнального домена рецептора IL-21 или внутриклеточного сигнального домена рецептора трансформирующего фактора роста β (TGFB).

Иллюстративные модификации

[00077] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды, представленные в настоящем документе, модифицированы, например, путем ацилирования, амидирования, гликозилирования, метилирования, фосфорилирования, сульфатирования, сумоилирования и/или убиквитинирования (или путем других модификаций белка).

[00078] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды, представленные в настоящем документе, помечены меткой, способной обеспечивать обнаруживаемый сигнал, например, радиоизотопом или флуоресцентным соединением.

[00079] В некоторых вариантах осуществления одна или более боковых цепей сконструированных соединений, представленных в настоящем документе, являются дериватизированными, например, путем дериватизации лизинильных и аминоконцевых остатков с помощью ангидридов янтарной или других карбоновых кислот, или путем дериватизации, например, с имидоэфирами, такими как метилпиколинимидат; пиридоксальфосфат; пиридоксаль; хлорборгидридом; тринитробензолсульфоновой кислотой; О-метилизомочевинной; 2,4-пентандионом и реакцией с глиоксилатом, катализируемой трансаминазой. В некоторых вариантах осуществления карбоксильные боковые группы, аспартил или глутамил, могут быть селективно модифицированы путем реакции с карбодиимидами (R-N=C=N-), такими как 1-циклогексил-3-(2-морфолинил-(4-этил)карбодиимид или 1-этил-3-(4-азония-4,4-диметилпентил)карбодиимид.

Иллюстративные нуклеиновые кислоты

[00080] В настоящем документе представлены нуклеиновые кислоты, кодирующие описанные здесь сконструированные полипептиды. Нуклеиновые кислоты, полезные для получения сконструированных полипептидов, описанных в настоящем документе, включают ДНК, РНК и аналоги нуклеиновых кислот. Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть модифицированы по основному фрагменту, сахарному фрагменту или фосфатному

остову и могут включать замену дезокситимидина на дезоксиуридин, замену дезоксицитидина на 5-метил-2'-дезоксицитидин или 5-бром-2'-дезоксицитидин. Модификации сахарного фрагмента могут включать модификацию 2'-гидроксила сахара рибозы с образованием 2'-О-метилового или 2'-О-аллильного сахаров. Дезоксирибозофосфатный остов может быть модифицирован для получения морфолинонуклеиновых кислот, в которых каждый основной фрагмент связан с шестичленным морфолиновым кольцом, или пептидных нуклеиновых кислот, в которых дезоксифосфатный остов заменен на псевдопептидный остов, и четыре основания сохраняются. См., например, Summerton and Weller (1997) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7: 187-195; и Нурр et al. (1996) *Bioorgan. Med. Chain.* 4:5-23. Кроме того, дезоксифосфатный остов может быть заменен, например, фосфоротиоатным или фосфородитиоатным остовом, фосфоамидитным или алкилфосфотриэфирным остовом.

[00081] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие сконструированные полипептиды, описанные в настоящем документе, содержатся в векторе нуклеиновой кислоты. Например, представляющие интерес клетки, например, Т-лимфоциты, могут быть трансформированы с применением синтетических векторов, лентивирусных или ретровирусных векторов, автономно реплицирующихся плазмид, вируса (например, ретровируса, лентивируса, аденовируса или вируса герпеса) и тому подобное, содержащих нуклеиновую кислоту (полинуклеотиды), кодирующую сконструированные полипептиды, описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления вектор, содержащий сконструированные полипептиды, описанные в настоящем документе, представляет собой ретровирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую сконструированные полипептиды, описанные в настоящем документе, представляет собой лентивирусный вектор. Лентивирусные векторы, подходящие для трансформации клеток, например, Т-лимфоцитов, включают, но не ограничиваются ими, лентивирусные векторы, описанные в патентах США № 5994136; 6165782; 6428953; 7083981 и 7250299. Векторы HIV, подходящие для трансформации клеток, например, Т-лимфоцитов, включают, но не ограничиваются ими, векторы, описанные в патенте США № 5665577.

[00082] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие сконструированные полипептиды, описанные в настоящем документе, функционально связаны с промотором. В некоторых вариантах осуществления указанный промотор представляет собой промотор, специфичный для Т-клеток, промотор, специфичный для

естественных клеток-киллеров (NK), индуцируемый промотор, который функционирует внутри Т-клеток или NK-клеток, или конститутивный промотор.

Иллюстративные клетки

[00083] Сконструированные полипептиды, представленные в настоящем документе, могут быть экспрессированы в клетках, которые пригодны для экспрессии сконструированного полипептида, такого как CAR, то есть, клетки сконструированы таким образом, чтобы содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую сконструированный полипептид, представленный в настоящем документе, таким образом, что при экспрессии нуклеиновой кислоты в клетке, эта клетка экспрессирует сконструированный полипептид, описанный здесь. Например, описанные здесь сконструированные полипептиды могут экспрессироваться в Т-лимфоцитах или естественных клетках-киллерах. Представленные здесь клетки, которые экспрессируют описанные здесь CAR, могут обозначаться как «CAR-клетки».

[00084] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлена клетка (например, Т-лимфоцит или естественная клетка-киллер), которая была модифицирована для экспрессии сконструированного полипептида, содержащего домен деградации, представленный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления клетка была модифицирована для экспрессии сконструированного полипептида, который представляет собой CAR, содержащий (а) компоненты CAR, такие как антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, клеточный сигнальный домен и/или костимулирующий домен, и (b) домен деградации. В некоторых вариантах осуществления клетка была модифицирована для экспрессии сконструированного полипептида, содержащего домен деградации, слитый с другим белком или встроенный в него. Приведение в контакт модифицированной клетки с агентом деградации, представленным в настоящем документе, приводит к убиквитинированию и деградации сконструированного полипептида.

[00085] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды, представленные в настоящем документе, экспрессируются в Т-лимфоцитах. Т-лимфоциты могут быть наивными Т-лимфоцитами или МНС-рестриктированными Т-лимфоцитами. В некоторых вариантах осуществления Т-лимфоциты представляют собой лимфоциты, инфильтрирующие опухоль (TIL). В некоторых вариантах осуществления Т-лимфоциты выделяют из образца биопсии опухоли или размножают из Т-лимфоцитов, выделенных из образца биопсии опухоли. В некоторых других вариантах осуществления Т-лимфоциты

выделяют или размножают из Т-лимфоцитов, размноженных из периферической крови, пуповинной крови или лимфы.

[00086] В некоторых вариантах осуществления клетки (например, Т-лимфоциты), сконструированные таким образом, чтобы содержать/экспрессировать сконструированный полипептид, описанный в настоящем документе, являются аутологичными для индивидуума, которому эти клетки (например, Т-лимфоциты) должны быть введены как часть способа лечения, описанного здесь. В других вариантах осуществления клетки (например, Т-лимфоциты), сконструированные таким образом, чтобы содержать/экспрессировать сконструированный полипептид, описанный в настоящем документе, являются аллогенными для индивидуума, которому эти клетки (например, Т-лимфоциты) должны быть введены. Если для получения модифицированных клеток, таких как CAR-клетки, применяются аллогенные клетки (например, Т-лимфоциты), предпочтительно выбирать клетки (например, Т-лимфоциты), которые уменьшают вероятность реакции трансплантат против хозяина (GVHD) у индивидуума. Например, в некоторых вариантах осуществления для получения CAR Т-лимфоцитов выбирают вирусспецифические Т-лимфоциты; ожидается, что такие лимфоциты будут иметь значительно сниженную нативную способность связываться с любыми антигенами реципиента и, таким образом, активироваться ими. В некоторых вариантах осуществления опосредованное реципиентом отторжение аллогенных клеток (например, Т-лимфоцитов) может быть уменьшено путем одновременного введения хозяину одного или более иммуносупрессивных агентов, например, циклоспорина, такролимуса, сиролимуса, циклофосфида или тому подобного.

[00087] В некоторых вариантах осуществления Т-лимфоциты получают от индивидуума, необязательно размножают, и затем трансформируют вектором, кодирующим сконструированный полипептид, представленный в настоящем документе, и необязательно затем размножают. В некоторых вариантах осуществления Т-лимфоциты получают от индивидуума, необязательно размножают, и затем трансформируют вектором, кодирующим сконструированный полипептид, который представляет собой CAR, описанный в настоящем документе, и затем необязательно размножают. В некоторых вариантах осуществления клетки, содержащие вектор, могут быть получены с применением селективируемого маркера. В некоторых вариантах осуществления Т-лимфоциты получают от индивидуума, необязательно размножают, и затем модифицируют для вставки домена деградации в ген целевого эндогенного белка таким образом, что экспрессируется сконструированный полипептид, который содержит домен деградации,

слитый с эндогенным белком или встроенный в него. Модифицированные Т-лимфоциты необязательно могут быть дополнительно размножены.

[00088] В некоторых вариантах осуществления Т-лимфоциты, применяемые для экспрессии сконструированных полипептидов, представленных в настоящем документе, содержат нативные белки TCR, например, TCR- α и TCR- β , которые способны образовывать нативные комплексы TCR. В некоторых других вариантах осуществления один или оба нативных гена, кодирующих TCR- α и TCR- β в Т-лимфоцитах, модифицируются таким образом, чтобы они стали нефункциональными, например, часть или все удаляются или вставляется мутация.

[00089] В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен(ы) CAR, описанный в настоящем документе, может применяться для стимулирования пролиферации и экспансии клеток (например, Т-лимфоцитов), содержащих/экспрессирующих CAR. Например, немодифицированные Т-лимфоциты и Т-лимфоциты, содержащие полипептид, содержащий сигнальный домен CD3 ζ и костимулирующий домен CD28, могут быть размножены с применением антител к CD3 и CD28, например, антител, прикрепленных к гранулам; см., например, патенты США № 5948893; 6534055; 6352694; 6692964; 6887466 и 6905681. Аналогично, антитела к сигнальному мотиву могут применяться для стимуляции пролиферации клеток (например, Т-лимфоцитов), содержащих описанный здесь CAR.

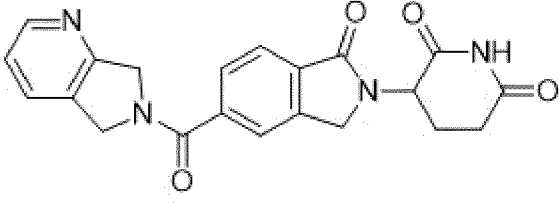
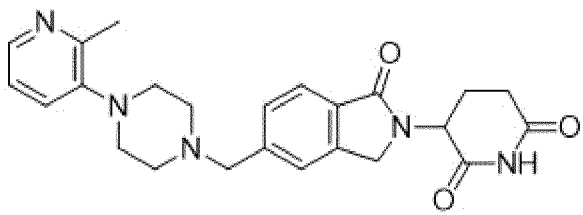
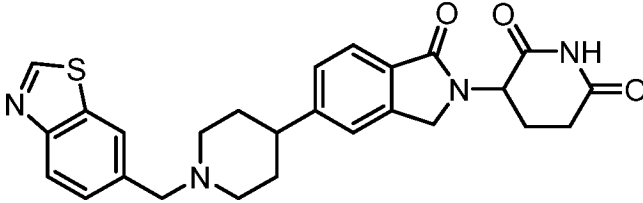
[00090] В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид может применяться в качестве «суицидного гена» или «предохранителя», который позволяет при необходимости уничтожать практически все клетки, экспрессирующие сконструированный полипептид. Например, домен деградации может быть встроен в ген, который экспрессирует эндогенный белок, необходимый для выживания и/или для определенной активности клетки. Приведение в контакт клетки с агентом деградации приводит к убиквитинированию и деградации эндогенного белка (то есть, сконструированного полипептида, содержащего домен деградации и эндогенный белок), подавлению активности клетки или уничтожению клетки.

Иллюстративные агенты деградации

[00091] В контексте настоящего документа термин «агент деградации» относится к молекуле (например, малой молекуле), способной связывать домен деградации, представленный в настоящем документе, и убиквитинлигазу, такую как E3 лигаза. В некоторых вариантах осуществления агент деградации связывается с доменом деградации и связывается с церебллоном. В некоторых вариантах осуществления агент деградации

связывает домен деградации и убиквитинлигазу, что приводит к ассоциации между лигазой E3 и доменом деградации. В некоторых таких вариантах осуществления сконструированный полипептид, содержащий домен деградации, убиквитинируется убиквитинлигазой после ассоциации, опосредованной агентом деградации.

[00092] В некоторых вариантах осуществления агент деградации представляет собой соединение, связывающее цереблон. В некоторых вариантах осуществления агент деградации представляет собой 3-(5-(6,7-дигидро-5H-пирроло[3,4-b]пиридин-6-карбонил)-1-оксоизоиндолин-2-ил)пиперидин-2,6-дион (Соединение В), 3-(5-((4-(2-метилпиридин-3-ил)пиперазин-1-ил)метил)-1-оксоизоиндолин-2-ил)пиперидин-2,6-дион (Соединение С) или 3-[5-[1-(1,3-бензотиазол-6-илметил)-4-пиперидил]-1-оксоизоиндолин-2-ил]пиперидин-2,6-дион (Соединение D).

Соединение	Структура	Наименование
В		3-(5-(6,7-дигидро-5H-пирроло[3,4-b]пиридин-6-карбонил)-1-оксоизоиндолин-2-ил)пиперидин-2,6-дион
С		3-(5-((4-(2-метилпиридин-3-ил)пиперазин-1-ил)метил)-1-оксоизоиндолин-2-ил)пиперидин-2,6-дион
Д		3-[5-[1-(1,3-бензотиазол-6-илметил)-4-пиперидил]-1-оксоизоиндолин-2-ил]пиперидин-2,6-дион

[00093] В некоторых вариантах осуществления агент деградации представляет собой соединение, раскрытое в WO 2019/038717 A1, содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00094] Агент деградации, применяемый в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, или его энантиомер или смесь энантиомеров; или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф могут быть доставлены в виде однократной дозы, такой как, например, однократная

болюсная инъекция или пероральные таблетки или пилюли; или с течением времени, как, например, непрерывная инфузия с течением времени или дробное введение болюсных доз с течением времени.

[00095] Агенты деградации, применяемые в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, могут быть составлены для внутривенного, внутриартериального, парентерального, внутримышечного, подкожного, интратекального или внутриглазного введения или введения в конкретный орган или ткань.

Иллюстративные способы

[00096] В некоторых вариантах осуществления представлен способ снижения уровня сконструированного полипептида, содержащего домен деградации, включающий приведение сконструированного полипептида в контакт с агентом деградации. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт происходит в клетке, и агент деградации связывается с доменом деградации и убиквитинлигазой, что приводит к убиквитинированию и деградации сконструированного полипептида. В некоторых вариантах осуществления деградация сконструированного полипептида приводит к снижению, по меньшей мере, одной активности клетки и/или повышению, по меньшей мере, одной активности клетки и/или гибели клетки. Неограничивающие примеры эффектов включают снижение порога активации клетки (такой как Т-клетка), повышение функциональной персистенции клетки (такой как Т-клетка), содействие выживанию клетки и усиление пролиферации клетки. В некоторых вариантах осуществления агент деградации представляет собой Соединение В, Соединение С или Соединение D. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение агента деградации субъекту, при этом субъект содержит клетки, которые содержат сконструированный полипептид.

[00097] В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид разрушается в присутствии агента деградации. В некоторых вариантах осуществления агент деградации взаимодействует с доменом деградации и с убиквитинлигазой, такой как церблон. В некоторых вариантах осуществления агент деградации опосредует комплекс, включающий домен деградации, агент деградации и убиквитинлигазу, что приводит к убиквитинированию сконструированного полипептида.

[00098] Модифицированные клетки, представленные в настоящем документе, такие как Т-лимфоциты (то есть, Т-клетки), модифицированные для включения/экспрессии сконструированного полипептида (например, CAR-клетки), могут применяться для лечения индивидуума, которому будут полезны модифицированные клетки, например, по причине наличия у индивидуума онкологического заболевания, экспрессирующего

мишень для CAR. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой эффекторную Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой CD4⁺ Т-клетку или CD8⁺ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления либо Т-клетка, эффекторная Т-клетка, CD4⁺ Т-клетка, либо CD8⁺ Т-клетка содержат сконструированный полипептид.

[00099] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы уничтожения клеток-мишеней, которые экспрессируют антиген, связанный антигенсвязывающим доменом CAR, описанного в настоящем документе, при этом указанные способы включают приведение в контакт указанных клеток-мишеней с модифицированной клеткой, представленной в настоящем документе (например, Т-клеткой или НК-клеткой), содержащей/экспрессирующей CAR, описанный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления указанная клетка-мишень представляет собой раковую клетку, например, клетку рака крови или клетку солидной опухоли. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения рака, при этом указанные способы включают введение субъекту популяции модифицированных клеток, описанных в настоящем документе, например, Т-клеток или НК-клеток, которые содержат/экспрессируют CAR, описанный в настоящем документе, где указанный CAR содержит антигенсвязывающий домен, специфичный для ракового антигена (например, TSA или TAA).

[000100] В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень или раковая клетка экспрессирует один или более следующих антигенов или их фрагмент: 4-1BB, 5T4, 8H9, B7-H6, антиген аденокарциномы, α -фетопротеин, антиген созревания В-клеток (BCMA), BAFF, В-клеточной лимфомы, антиген C242, CA9, карциноэмбриональный антиген, CA-125, карбоангидразу 9 (CA-IX), CCR4, CD3, CD4, CD 19, CD20, CD22, CD23 (IgE рецептор), CD28, CD30 (TFRSF8), CD33, CD38, CD40, CD44v6, CD44v7/8, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CD123, CD152, CD171, CD200, CD221, CE7, CEA, C-MET, CNT0888, CTLA-4, DRS, EpcAM, ErbB2, ErbB3/4, EGFR, EGFRvIII, EphA2, EGP2, EGP40, FAP, фетальный AchR, дополнительный домен В фибронектина, фолатный рецептор α , фолатный рецептор 1, G250/CAIX, GD2, GD3, гликопротеин 75, GP MB, HER2/neu, HGF, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, HMW-MAA, киназу рецептора фактора рассеяния человека, рецептор IGF-1, IGF-I, IgG1, IL-6, IL-13, рецептор IL-13 α 2, рецептор IL-11 α , рецептор инсулиноподобного фактора роста I, интегрин α 5 β 1, интегрин α v β 3, легкую каппа-цепь, L1-CAM, легкую лямбда-цепь, антиген Leu, мезотелин, MORAb-009, MS4A1, MUC1, MUC1 6, муцин CanAg, NCAM, N-гликолилнейраминую кислоту, лиганды NKG2D, NPC-IC, PDGF-R α , PDL192, фосфатидилсерин, простатспецифический раковый антиген (PSCA),

клетки карциномы предстательной железы, PSMA, PSC1, RANKL, RON, ROR1, SCH 900105, SDC1, SLAMF7, spl7, TAG72, тенасцин С, TGF β 2, TGF- β 3, TL1A, TRAIL-R1, TRAIL-R2, опухолевый антиген СТАА16.88, UPK1B, VEGF-A, рецепторы VEGF, VEGFR-1, VEGFR2, TEM1, TEM8 и/или виментин.

[000101] В некоторых вариантах осуществления после введения модифицированных клеток, представленных в настоящем документе, таких как клетки CAR, может быть желательным уменьшить или устранить экспрессию CAR и, таким образом, уменьшить или устранить избирательное уничтожение клеток. В некоторых таких вариантах осуществления способ может дополнительно включать введение субъекту агента деградации, представленного в настоящем документе. Введение агента деградации приводит к деградации сконструированного полипептида (например, CAR) и уменьшает или исключает нацеливание модифицированных клеток на клетки, экспрессирующие антиген, связанный антигенсвязывающим доменом CAR. Таким образом, можно модулировать активность лечения клетками CAR и повысить безопасность.

[000102] В некоторых вариантах осуществления указанную популяцию модифицированных клеток сначала вводят субъекту с последующим введением агента деградации через определенный период времени после введения популяции модифицированных клеток, например, через 30 минут, 1 час, 6 часов, 12 часов, 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней или 1 неделю после введения популяции клеток.

[000103] В некоторых вариантах осуществления агент деградации представляет собой Соединение В, Соединение С или Соединение D.

[000104] Неограничивающий перечень онкологических заболеваний, которые можно лечить в соответствии со способами лечения, описанными в настоящем документе, включает лимфому, лейкоз, рак легких, рак молочной железы, рак простаты, аденокортикальную карциному, карциному щитовидной железы, карциному носоглотки, меланому, рак кожи, колоректальную карциному, десмоидную опухоль, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, эндокринную опухоль, саркому Юинга, периферическую примитивную нейроэктодермальную опухоль, солидную герминогенную опухоль, гепатобластому, нейробластому, нерабдомиосаркомоподобную саркому мягких тканей, остеосаркому, ретинобластому, рабдомиосаркому, опухоль Вильмса, глиому, глиобластому, миксому, фиброму и липому. Иллюстративные лимфомы и лейкозы включают, без ограничения, хронический лимфоцитарный лейкоз (мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому), В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, лимфоплазмоцитарную лимфому, макроглобулинемию Вальденстрема, лимфому маргинальной зоны селезенки, плазматическую миелому, плазмоцитому,

экстранодальную В-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны, MALT-лимфому, узловую В-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны, фолликулярную лимфому, лимфому из клеток мантийной зоны, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, медиастинальную (тимическую) крупноклеточную В-клеточную лимфому, внутрисосудистую крупноклеточную В-клеточную лимфому, первичную выпотную лимфому, лимфому Беркитта, Т-лимфоцитарный пролимфоцитарный лейкоз, Т-лимфоцитарный крупнозернистый лимфоцитарный лейкоз, агрессивный НК-клеточный лейкоз, Т-лимфоцитарный лейкоз/лимфому взрослых, экстранодальную НК/Т-лимфоцитарную лимфому, назальный тип, Т-лимфоцитарную лимфому, ассоциированную с энтеропатией, Т-клеточную лимфому печени и селезенки, бластную НК-клеточную лимфому, грибовидный микоз, синдром Сезари, первичную кожную анапластическую крупноклеточную лимфому, лимфоматоидный папулез, ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому, периферическую Т-лимфоцитарную лимфому (неуточненную), анапластическую крупноклеточную лимфому, лимфому Ходжкина или неходжкинскую лимфому.

[000105] Эффективность описанных здесь модифицированных клеток, таких как клетки CAR, при лечении заболевания или расстройства, например, при лечении индивидуума, имеющего онкологическое заболевание, может быть оценена по одному или более критериям, специфичным для конкретного заболевания или расстройства, известным специалистам в данной области как показатель прогрессирования заболевания или расстройства. В общем случае, введение клеток CAR (например, CAR Т-лимфоцитов) индивидууму, имеющему заболевание/расстройство (например, рак), является эффективным, когда один или более из указанных критериев заметно, например, значительно, перемещаются от значения или диапазона болезненного состояния к или в направлении нормального значения или диапазона.

[000106] Описанные здесь модифицированные клетки могут быть приготовлены в любом фармацевтически приемлемом растворе, предпочтительно, растворе, подходящем для доставки живых клеток, например, солевом растворе (таком как раствор Рингера), желатине, углеводах (например, лактозе, амилозе, крахмале или подобные), содержащем сложные эфиры жирных кислот, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидин и т.д. Такие лекарственные средства предпочтительно стерилизуют перед добавлением клеток CAR и могут быть смешаны со вспомогательными агентами, такими как смазывающие агенты, консерванты, стабилизаторы, эмульгаторы, соли для влияния на осмотическое давление, буферы и окрашивающие вещества. Фармацевтические носители, подходящие

для применения в составе клеток CAR, известны в данной области техники и описаны, например, в WO 96/05309.

[000107] В некоторых вариантах осуществления модифицированные клетки (например, CAR-клетки), описанные в настоящем документе, составляют в виде индивидуальных доз, где указанные индивидуальные дозы содержат, по меньшей мере, не более или около 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} или 1×10^{11} клеток.

[000108] В некоторых вариантах осуществления модифицированные клетки (например, CAR-клетки), описанные в настоящем документе, составлены для внутривенного, внутриартериального, парентерального, внутримышечного, подкожного, интратекального или внутриглазного введения или введения в конкретный орган или ткань.

7. ПРИМЕРЫ

7.1. Пример 1: IKZF1 ZNF2 CAR, меченные G-мотивом, сохраняют функцию

[000109] Функцию IKZF1 ZNF2 меченных CD19 CAR T-клеток (Фиг. 2, аминокислотная последовательность ZNF2 SEQ ID NO: 15) оценивали в репортерном анализе, в котором клетки Jurkat были сконструированы для экспрессии tdTomato, когда ген Nur77, связанный с активацией CAR и TCR, активно транскрибируется (Фиг. 3). Lentiviral векторы, кодирующие ZNF-меченный CD19 CAR, немеченый CD19 CAR или немеченый отрицательный контроль BCMA CAR, трансдуцировали в репортерную клеточную линию Jurkat. Трансдуцированные клетки затем совместно культивировали с линией клеток-мишеней K562, экспрессирующей CD19, при 37°C. Уровни tdTomato, как в виде средней интенсивности флуоресценции (MFI), так и общего процента позитивных клеток, оценивали с помощью проточной цитометрии каждые 2 часа в течение 12 часов. Результаты показали, что как время, так и уровни активации CAR были идентичны между мечеными и немечеными CD19 CAR, тогда как BCMA CAR T оказались не активированными в присутствии линии клеток-мишеней CD19 (Фиг. 4A).

[000110] Для оценки уровня деградации CAR, достигаемого при различных концентрациях Соединения А, проводили титрование лекарственного средства Соединения А (Фиг. 4B) на Jurkats, трансдуцированных IKZF1 ZNF2-меченным или немеченым CD19 CAR. Соединение А показано в публикации США № 2019/0008852 А1 на стр. 42, Таблица 4 (Compound A). Клетки инкубировали с Соединением А в течение 24 часов при 37°C, после чего уровни CAR оценивали с помощью проточной цитометрии. Данные показывают, что дегрон IKZF1 ZNF2 с G-мотивом опосредует деградацию CAR на ~55% при высоких концентрациях Соединения А (Фиг. 4C). Этот уровень деградации CAR

может оказаться недостаточным для ингибирования активности CAR при воздействии K562, экспрессирующего антиген, распознаваемый CAR (данные не представлены). Этот результат послужил поводом для поиска модификации последовательности белка дегрона, чтобы он мог более эффективно реагировать на Соединение А.

7.2. Пример 2: Оценка альтернативных конфигураций цинковых пальцев IKZF1

[000111] Дегрон IKZF1-ZNF2 был дополнительно модифицирован для улучшения деградации CAR. Немеченый CAR и CAR, меченный исходными дегронами IKZF1-ZNF2, тестировали наряду с альтернативными ориентациями и комбинациями IKZF1, ZNF1, ZNF2 и ZNF3 (Фиг. 5А). Каждый CAR включал трансмембранный домен CD28, костимулирующий домен 4-1BB и сигнальный домен CD3 ζ (CD3z). Дегроны IKZF1 были слиты с С-концом. См. SEQ ID NO: 53-57. Lentivirusный вектор, кодирующий немеченый CD19 CAR или CAR, меченный различными конфигурациями IKZF1-ZNF, трансдуцировали в клеточную линию Jurkat. Трансдуцированные клетки сначала совместно культивировали с линией клеток-мишеней K562, экспрессирующей CD19, при 37°C в течение 7,5 часов, и нормализованные уровни репортера tdTomato оценивали с помощью проточной цитометрии. Результаты показали, что ни одна из меток дегрона не снижала активность CAR в присутствии антигена по сравнению с немеченым CAR (Фиг. 5В). Затем трансдуцированные CAR клетки Jurkat культивировали при 37°C в течение 24 часов в условиях титрования Соединения А для определения значений Y-max и EC50 для каждого дегрона. В результате этого эксперимента было установлено, что мечение ZNF2_3 приводит к усилению деградации при самых низких концентрациях Соединения А (Фиг. 5С). Мечение ZNF1_2 было исключено, поскольку ZNF1 содержит G-мотив и усложняет тандемный дегрон. Поэтому эта конфигурация была выбрана для дальнейшего тестирования.

[000112] Чтобы продемонстрировать, что эта деградация зависела от функционального дегрона, CAR, меченный WT ZNF2_3 (SEQ ID NO: 13), тестировали, как указано выше, с титрованием Соединения А вместе с CAR, меченным ZNF2_3, содержащим мутацию G6N в G-мотиве. (QCNQCNASF; SEQ ID NO: 17) (Фиг. 5D). В то время как WT дегрон вызывал глубокую деградацию CAR при более высоких концентрациях Соединения А, мутантный CAR, меченный G6N, не реагировал на Соединение А ни в какой дозе. Эти результаты позволяют предположить, что остаток G6 G-мотива способствует взаимодействию Соединения А с оптимизированным ZNF2_3 дегроном.

7.3. Пример 3: Деградация IKZF1 ZNF2_3 меченного CAR ингибирует активность

[000113] Способность подавлять передачу сигнала CAR T путем деградации IKZF1 ZNF2_3-меченных CD19 CAR T-клеток оценивали в анализе репортерной линии Jurkat. Lentivirusный вектор, кодирующий меченный или немеченный ZNF2_3 CD19 CAR (см. Пример 2), трансдуцировали в репортерную клеточную линию. Трансдуцированные клетки затем предварительно обрабатывали в течение 48 часов 100 нМ Соединения А, затем сокультивировали с экспрессирующей CD19 целевой клеточной линией K562 при 37°C в течение 8 часов. Уровни tdTomato в виде средней интенсивности флуоресценции (MFI) (Фиг. 6B) и общего процента позитивных клеток, а также нормализованные уровни CAR (Фиг. 6C) оценивали с помощью проточной цитометрии (Фиг. 6A). При этой концентрации Соединения А деградация CAR, содержащих ZNF2_3 дегрон, была достаточно глубокой, чтобы в высокой степени ингибировать активность CAR при введении клеток K562, экспрессирующих распознанный антиген.

[000114] Подавление передачи сигнала при деградации CAR оценивали путем измерения активации нисходящего сигнального пути MAPK. Клетки Jurkat трансдуцировали немеченым, меченым WT дегроном или меченым дегроном G6N CAR, как описано выше. Клетки предварительно обрабатывали 1 мМ Соединения А в течение 12 часов при 37°C, затем сокультивировали либо с родительскими, либо с CD19-экспрессирующими клетками K562 в течение 30 минут. Затем клетки осаждали, лизировали, обрабатывали денатурирующим белковым гелем, переносили на мембрану, зондировали антителом и визуализировали с помощью пленки (Фиг. 7). Эти результаты показывают, что эндогенные сигнальные пути, активируемые CAR, представленные здесь фосфорилированием Erk (pErk), ослабляются в присутствии антигена после введения Соединения А в клетки, которые содержат WT IKZF1 ZNF2_3 CAR, меченные ZNF2_3.

7.4. Пример 4: Мутагенез дегрона для идентификации новых пар дегрон-соединение

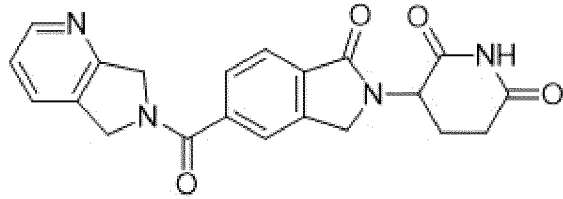
[000115] Структурные исследования показывают, что положение 1 G-мотива находится в непосредственной близости от соединения, когда субстраты связаны с комплексами цереблон/соединение (не показано). Выравнивание последовательностей G-мотива дегрона семейства IKZF (Фиг. 8) и прогнозируемые дегроны внутри других цинковых пальцев C2H2 (Фиг. 9) обнаруживают разнообразный набор аминокислот в этом положении. Следовательно, чтобы идентифицировать дополнительные пары соединение:дегрон, были произведены мутации в положении Q1 IKZF1 ZNF2, и потенциальные соединения были подвергнуты скринингу в отношении активности против этих мутантов. Были созданы плазмиды, содержащие Ikaros MBP-ZNF2 (141-196 а.к.) с

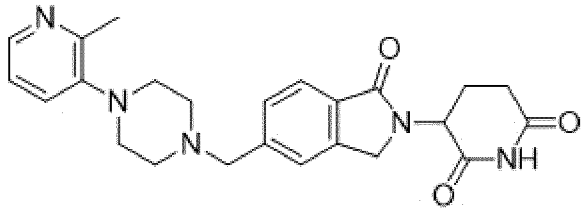
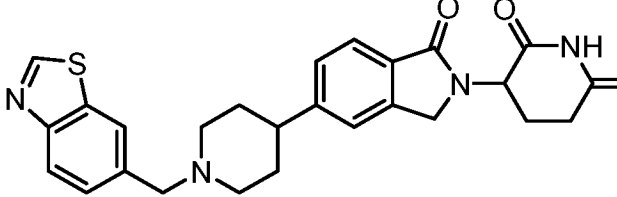
альтернативными аминокислотами в положении Q1, и был проведен скрининг убиквитинирования *in vitro* с применением различных соединений, включая Соединение В (Фиг. 10А). После обработки клетки затем осаждали, лизировали, обрабатывали денатурирующим белковым гелем, переносили на мембрану, зондировали антителом и визуализировали с помощью пленки (Фиг. 10В). Как показано на Фиг. 10В, IKZF1 ZNF2 Q1F существенно убиквитинировался в присутствии Соединения В.

7.5. Пример 5: Скрининг малых молекул для выявления соединений с высокой активностью против Q1F дегрона

[000116] Ряд потенциальных соединений, нацеленных на дегрон, подвергали скринингу в отношении Q1F дегрона, в результате чего был получен набор высокоактивных пар дегрон/малые молекулы. Lentiviral векторы, содержащие CD19 CAR, меченные IKZF1 ZNF2_ZNF3 Q1F Nluc, трансдуцировали в клетки линии Jurkat. CD19 CAR был подобен CD19 CAR в Примере 2, но содержал ZNF2_ZNF3 Q1F дегрон (SEQ ID NO: 19). Трансдуцированные клетки обрабатывали титрованием каждой малой молекулы или без применения лекарственного средства, и затем инкубировали при 37°C в течение 18 часов. Клетки промывали и окрашивали соответствующим окрашивающим реагентом для измерения уровней CAR. Клетки инкубировали при 4°C в окрашивающих реагентах в течение 20 минут, и затем 3 раза промывали перед считыванием на проточном цитометре. Уровни CAR были нормализованы к клеткам, которые не обрабатывались лекарственным средством. Значения EC50 и Ymin рассчитывали с применением полученной кривой титрования. Это выявило малые молекулы, которые эффективно разлагали CAR, меченные Q1F дегроном (Таблица 1).

Таблица 1: Q1F-специфические соединения

Соединение	Структура	EC50 (Q1F дегрон)	Ymin (Q1F дегрон)
В		0,0048 мкМ	1,7%

C		0,023 мкМ	12%
D		0,0007 мкМ	4,2%

7.6. Пример 6: IKZF1 ZNF2_3 Q1F-меченные CAR подвергаются деградации зависимым от CRBN и убиквитин-протеасомных путей способом в присутствии Соединения С

[000117] Оценивали зависимость деградации CAR, меченного Q1F дегроном, от CRBN и протеолитического пути, опосредованного убиквитином. CD19-нацеленный CAR был помечен либо IKZF1 ZNF2_3 Q1F (SEQ ID NO: 19), либо Q1F/G6N (SEQ ID NO: 59). Lentiviral векторы, содержащие эти меченые CAR, затем трансдуцировали в клетки Jurkat дикого типа (WT) или с нокаутом (KO) по cerebrin (CRBN).

[000118] Чтобы определить, может ли меченный Q1F CAR подвергаться деградации с помощью Соединения С CRBN-зависимым образом, трансдуцированные клетки Jurkat WT или Jurkat CRBN KO обрабатывали в течение 1 часа DMSO или 1 мМ Соединения С (Фиг. 11А) при 37°C, после чего уровни CAR оценивали методом проточной цитометрии. При этой концентрации Соединения С меченый CAR подвергался деградации до уровня ниже 20%, оставшегося в клетках Jurkat WT, тогда как уровни меченого CAR оставались идентичными уровню немеченого CAR в клетках Jurkat CRBN KO (Фиг. 11В). Затем определяли зависимость деградации CAR от убиквитин-протеасомного пути с помощью обработки клеток Jurkat WT, трансдуцированных меченым CAR, в течение 2 часов DMSO, 20 нМ или 200 нМ Соединения С отдельно, или совместно либо с 2 мкМ MLN4924 ингибитора фермента E1 NEDD8, либо 2 мкМ блокатора протеасом Бортезомиба (Фиг. 11С). Неэффективность деградации меченого CAR с помощью Соединения С в присутствии любого ингибитора демонстрирует, что функциональный убиквитин-протеасомный путь (UPP) является существенным для деградации меченого Q1F CAR.

7.7. Пример 7: Деградация IKZF1 ZNF2_3 Q1F меченого CAR ингибирует активность

[000119] Способность подавлять передачу сигнала CAR T путем деградации IKZF1 ZNF2_3 Q1F-меченных CD19 CAR T-клеток оценивали в анализе репортерной линии Jurkat

(Фиг. 2 и 3). Лентивирусный вектор, кодирующий ZNF2_3 Q1F или Q1F/G6N меченный CD19 CAR, трансдуцировали в репортерную клеточную линию. Трансдуцированные клетки затем предварительно обрабатывали 1 мМ Соединения С или Соединения В в течение 12 часов, затем сокультивировали с родительской или CD19-экспрессирующей целевой клеточной линией K562 при 37°C в течение 8 часов. Уровни tdTomato в виде общего процента позитивных клеток (Фиг. 12A), а также среднюю интенсивность флуоресценции (MFI, Фиг. 12B) оценивали с помощью проточной цитометрии. Дегградация CAR, содержащих ZNF2_3 Q1F дегрона, снижала передачу сигнала приблизительно на 30% при применении 1 мМ Соединения С и приблизительно на 75% при применении Соединения В; эта относительная разность коррелирует со степенью дегградации, наблюдаемой для каждого из них. Кроме того, снижение активности зависит от наличия интактного G-мотива, поскольку мутация G6N предотвращает ингибирование.

7.8. Пример 8: Дегградация IKZF1 ZNF2_3 Q1F меченного CAR ингибирует активность первичных Т-клеток

[000120] Оценивали возможность применения соединений для титрования первичной CAR Т эффекторной функции путем дегградации IKZF1 ZNF2_3 Q1F меченного анти-ROR1 CAR (Фиг. 13A). CAR включал такие же трансмембранные, костимулирующие и сигнальные домены, что и CD19 CAR, но с scFv против ROR1. Лентивирусный вектор, кодирующий меченный или немеченный ZNF2_3 Q1F анти-ROR1 CAR, трансдуцировали в активированные первичные Т-клетки. Трансдуцированные клетки размножали в течение 10 дней в среде, дополненной IL2, IL7 и IL15, и затем замораживали. Перед экспериментом клетки размораживали и оставляли в среде с титрованием дозы Соединения С или без лекарственного средства. Уровни CAR измеряли с помощью проточной цитометрии (Фиг. 13B), демонстрируя, что поверхностные уровни CAR, меченного ZNF2_3 Q1F, можно титровать с помощью диапазона концентраций Соединения С. Для определения влияния дегградации CAR на активность CAR Т, клетки затем сокультивировали с меченной красным Nuclight H-1975 ROR1, экспрессирующей линию клеток-мишеней, при соотношении эффектор:клетка-мишень 1:4. Сокультуры помещали в систему IncuCyte на 24 часа для мониторинга уничтожения опухоли с помощью сигнала Nuclight red (Фиг. 14A), и супернатанты собирали для измерения продукции провоспалительных цитокинов с помощью MSD (Фиг. 14B-14D; IL-2, TNF α и IFN γ). Эти эксперименты продемонстрировали, что эффекторную функцию первичных CAR Т-клеток, измеряемую как по уничтожению, так и по продукции цитокинов, можно титровать путем нацеливания

на CAR, меченный ZNF2_3 Q1F, для деградации с помощью различных концентраций Соединения С.

7.9. Пример 9: Деградация CAR посредством Q1F дегрона сохраняет функцию CAR во время длительного воздействия антигена *in vitro*

[000121] Функциональное влияние обеспечения временного покоя для первичных Т-клеток во время длительного воздействия антигена посредством деградации ZNF2_3 Q1F-меченного CD19 CAR было исследовано *in vitro*. Стимуляцию осуществляли с помощью планшетов, покрытых антителом, направленным против CAR scFv, и оценивали различную продолжительность покоя (Фиг. 15). Клетки обрабатывали 3,9 нМ Соединения D (Фиг. 16A), затем промывали и оставляли в среде, содержащей CAR, чтобы дать возможность полностью восстановиться перед повторным введением. Отдохнувшие клетки анализировали с помощью проточной цитометрии для оценки уровней CD27 и CD28 в качестве показателя для популяции наивных клеток (Фиг. 16B и 16C). Затем CAR Т-клетки подвергали воздействию линии опухолевых клеток, меченной Nuclight red, в сфероидном (3D) формате, и супернатанты собирали для измерения продукции провоспалительных цитокинов с применением анализа ELISA, Meso Scale Discovery. Эти эксперименты показывают, что предоставление CAR Т-клеткам периода временного покоя приводит к меньшей активации и поддержанию популяции более наивных клеток по сравнению с CAR Т-клетками, которые подвергаются постоянному воздействию антигена. Этот период временного покоя также обеспечивает функциональное преимущество с точки зрения продукции провоспалительных цитокинов, таких как IL-2, TNF α и IFN γ (Фиг. 17A), и противоопухолевой функции (Фиг. 17B); прогрессирующая потеря этих цитокинов и цитотоксичности является признаком истощения Т-клеток.

7.10. Пример 10: Деградация CAR посредством Q1F дегрона сохраняет функцию CAR во время длительного воздействия антигена *in vitro*

[000122] Оценивали способность подвергаться деградации ZNF2_3 Q1F-меченный CAR *in vivo*. Lentiviral вектор, кодирующий ZNF2_3 Q1F-меченный CD19 CAR, трансдуцировали в активированные первичные Т-клетки. Трансдуцированные клетки размножали в течение 10 дней в среде, дополненной IL2, IL7 и IL15, и затем замораживали.

[000123] Для определения способности подвергаться деградации меченного дегроном CAR *in vivo* в отсутствие опухоли CAR Т-клетки размораживали, оставляли в течение 24 часов и адоптивно переносили самкам мышей-неопухоленосителей с иммунодефицитом NSGTM в дозе 2×10^6 клеток на животное. Через 24 часа мышам перорально вводили

носитель в дозе 0,85 или 8,5 мг/кг Соединения D (Фиг. 18B). Забор крови производили через 8, 24, 48 и 72 часа (Фиг. 18A), и долю CAR+ Т-клеток, определенную путем окрашивания антителами против scFv и против CD3, оценивали с помощью проточной цитометрии. При обеих дозах менее 5% клеток CD3+ CAR+ оставались в течение 8 часов, и даже через 24 часа CAR оставался значительно деградированным (Фиг. 18C), демонстрируя, что CAR, меченный Q1F дегроном, может эффективно подвергаться деградации *in vivo*. Через 48 часов после введения дозы экспрессия CAR в значительной степени восстанавливалась (Фиг. 18C).

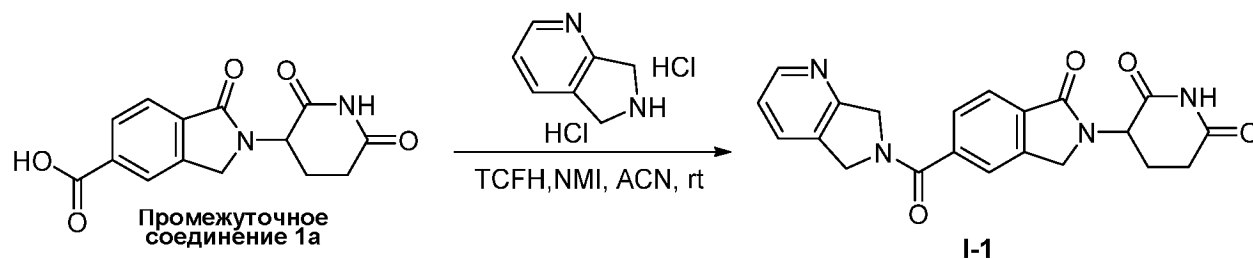
[000124] Для исследования снижения экспрессии меченного дегроном CAR *in vivo* на модели опухолевого ксенотрансплантата и влияния на функцию CAR Т, самкам мышей NSG™ вводили 5×10^5 опухолевых клеток Raji, стабильно экспрессирующих люциферазу Renilla. Через шесть дней CAR Т-клетки размораживали, выдерживали в течение 24 часов и адоптивно переносили мышам в дозе 2×10^6 клеток на животное. Мышам перорально вводили носитель или 6,85 мг/кг Соединения D два раза в день в дни 0 и 1 (Фиг. 19A). Отбирали кровь и измеряли флуоресценцию опухоли в дни D1, D3 и D10 (Фиг. 19A), и долю CAR+Т-клеток, определенную путем окрашивания антителами против scFv и против CD3, оценивали с помощью проточной цитометрии. Деградация CAR снижает размножение и цитолитическую функцию CAR-Т-клеток, меченных дегроном (Фиг. 19B-D), демонстрируя способность CAR циклически обеспечивать функциональный отдых CAR Т-клеток.

7.11. Пример 11: Нокин с применением метки дегрона в рамке считывания позволяет с помощью соединений контролировать уровни эндогенного белка

[000125] Была исследована способность вставлять метки дегрона в рамке считывания в геномные локусы, чтобы обеспечить опосредованную соединением модуляцию уровней эндогенного белка. Аденоассоциированные вирусные векторы были разработаны для доставки меток IKZF1 ZNF2_3-V5 tag-T2A-muThy1.1, которые должны быть вставлены в рамку считывания в локус AURA (Фиг. 20A-10B) или TOX (Фиг. 20C-20D) в клетках Jurkat как в N-, так и в C-концевой ориентациях. Затем клетки Jurkat подвергали электропорации с рибонуклеопротеинами Cas9/направляющей РНК. Через 5 дней нокаутированные клетки инкубировали с 1 мкМ Соединения А или DMSO в течение 16 часов. Затем клетки осаждали, лизировали, обрабатывали денатурирующим белковым гелем, переносили на мембрану, зондировали антителами и визуализировали с помощью пленки. Вестерн-блоттинг показал снижение уровней Auroga A (Фиг. 20A-20B) и меченого TOX (Фиг. 20D)

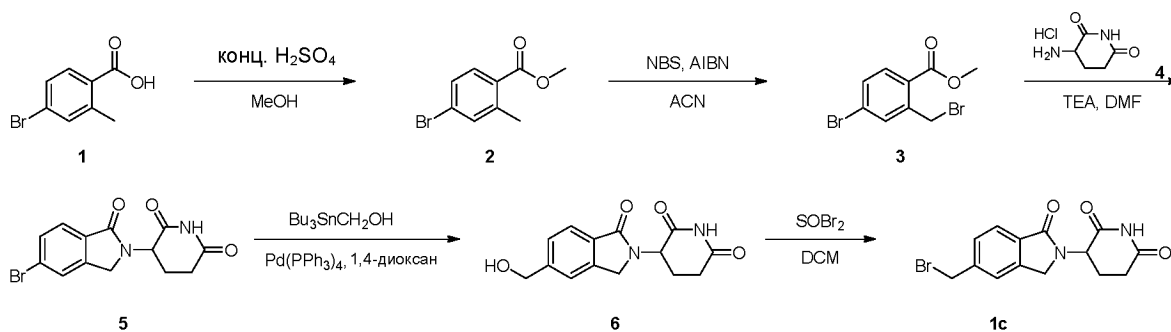
в присутствии Соединения А, что указывает на то, что мечение эндогенных белков дегронами позволяет контролировать уровни белка с помощью малых молекул.

7.12. Пример 12: Синтез 3-(5-(6,7-дигидро-5Н-пирроло[3,4-*b*]пиридин-6-карбонил)-1-оксоизоиндолин-2-ил)пиперидин-2,6-диона (Соединение В)

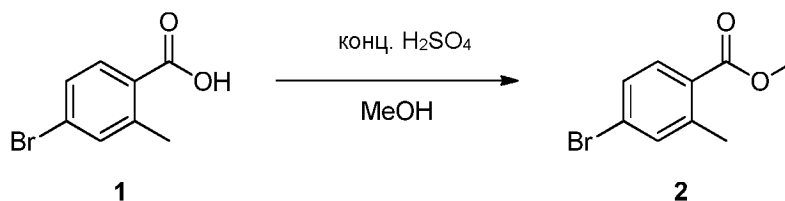


[000126] К раствору 2-(2,6-диоксо-3-пиперидил)-1-оксо-изоиндолин-5-карбоновой кислоты (400 мг, 1,4 ммоль) в CH_3CN (ACN) (5 мл) добавляли N,N,N',N' -тетраметилхлороформамина гексафторфосфат (TCFH) (779 мг, 2,8 ммоль), N -метилимидазол (NMI) (1,2 г, 14 ммоль) и 6,7-дигидро-5Н-пирроло[3,4-*b*]пиридин дигидрохлорид (349 мг, 1,8 ммоль). Затем смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Ход реакции контролировали с помощью ЖХ-МС. Выпавшие в осадок твердые вещества собирали фильтрованием. Неочищенное вещество очищали с помощью препаративной ВЭЖХ с получением 3-[5-(5,7-дигидропирроло[3,4-*b*]пиридин-6-карбонил)-1-оксо-изоиндолин-2-ил]пиперидин-2,6-диона (438,7 мг, 79% выход) в виде серого твердого вещества. Аналитическая ЖХ-МС (Способ 5): МС $[\text{M}+\text{H}^+]$ 391,1. ^1H ЯМР (300 МГц, $\text{DMSO-}d_6$): δ 11,03 (s, 1H), 8,54 - 8,43 (m, 1H), 7,94 - 7,65 (m, 4H), 7,41 - 7,23 (m, 1H), 5,23 - 5,11 (m, 1H), 5,00 - 4,75 (m, 4H), 4,62 - 4,36 (m, 2H), 3,04 - 2,84 (m, 1H), 2,69 - 2,56 (m, 1H), 2,50 - 2,36 (m, 1H), 2,12 - 2,00 (m, 1H).

7.13. Пример 13: Синтез 3-[5-(бромметил)-1-оксо-изоиндолин-2-ил]пиперидин-2,6-диона (Промежуточное соединение 1c)

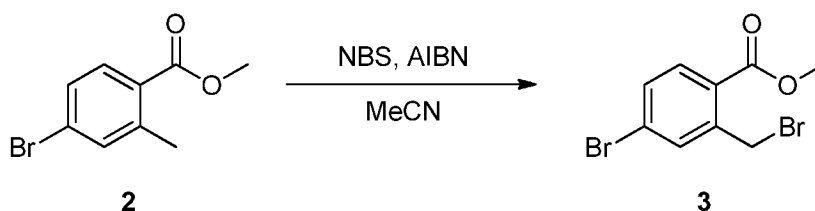


[000127] Синтез соединения 2



К раствору 4-бром-2-метил-бензойной кислоты (120 г, 558 ммоль) в метаноле (1,0 л) добавляли концентрированную серную кислоту (109 г, 1,12 моль, 60 мл) в промежутке 20 ~ 40°C, затем смесь нагревали до 65°C в течение 18 ч. TLC (петролейный эфир/этилацетат = 3:1, R_f (реагент) = 0,1, R_f (продукт) = 0,4) показала, что реакция завершена. Реакционную смесь концентрировали; остаток разделяли между водной фазой и органическим слоем. Водную фазу экстрагировали этилацетатом (1 л x 3). Объединенные органические слои промывали с помощью насыщенного водного бикарбоната натрия (500 мл), рассола (500 мл) и высушивали над безводным сульфатом натрия. Смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали с получением метил 4-бром-2-метил-бензоата (122 г, 95% выход) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 7,76 (d, $J = 8,4$ Гц, 1H), 7,40 (s, 1H), 7,35 (dd, $J = 8,4$ Гц, 1,6 Гц, 1H), 3,87 (s, 3H), 2,56 (s, 3H).

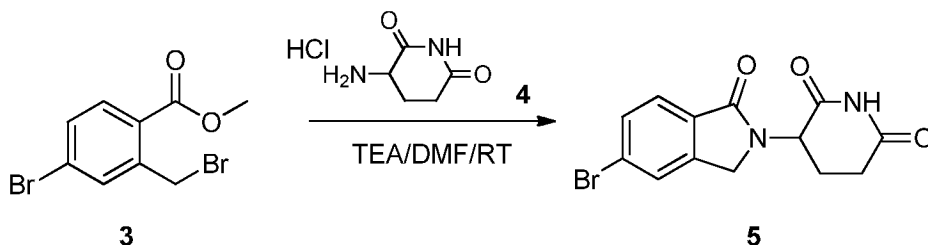
[000128] Синтез соединения 3



К раствору метил 4-бром-2-метил-бензоата (122 г, 533 ммоль) в ацетонитриле (1,20 л) добавляли 2,2'-азобис(2-метилпропионитрил) (6,12 г, 37,3 ммоль), реакционную смесь нагревали до 82°C, добавляли порциями N-бромсукцинимид (142 г, 799 ммоль) и перемешивали в течение 3 ч. ЖХ-МС показала, что реакция завершена. Реакционную смесь концентрировали под вакуумом (50°C). Остаток суспендировали в петролейном

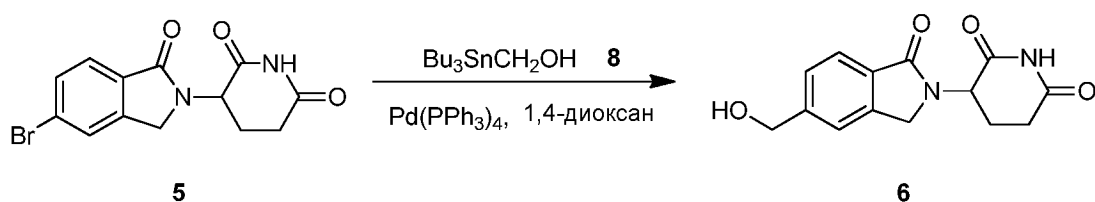
эфире/дихлорметане (20:1, 100 мл), фильтровали, и фильтрат концентрировали с получением 150 г неочищенного вещества, которое сразу применяли на следующей стадии без дополнительной очистки.

[000129] Синтез соединения 5



К раствору метил метил 4-бром-2-(бромметил)бензоата (115 г, 375 ммоль) и 3-аминопиперидин-2,6-диона (61,7 г, 375 ммоль, соль HCl) в N,N-диметилформамиде (80 мл) добавляли N,N-диизопропилэтиламин (145 г, 1,13 моль). Смесь перемешивали при 50°C в течение 16 ч. ВЭЖХ показала, что большая часть исходного материала была израсходована. К реакционной смеси добавляли уксусную кислоту (150 мл) и перемешивали в течение 1 ч при 50°C. ВЭЖХ показала, что Промежуточное соединение полностью израсходовано. Реакционную смесь охлаждали до 20°C и фильтровали, осадок на фильтре промывали водой (200 мл) и этилацетатом (200 мл) с получением 3-(5-бром-1-оксо-изоиндолин-2-ил)пиперидин-2,6-диона (91 г, 75,1% выход) в виде светло-голубого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆): δ 11,01 (s, 1H), 7,89 (s, 1H), 7,73-7,66 (m, 2H), 5,14-5,09 (m, 1H), 4,47 (d, *J* = 16 Гц, 1H), 4,34 (d, *J* = 16 Гц, 1H), 2,92-2,89 (m, 1H), 2,73-2,58 (m, 1H), 2,41-2,37 (m, 1H), 2,03-1,99 (m, 1H).

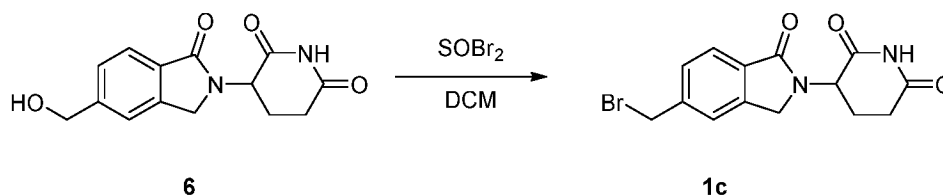
[000130] Синтез соединения 6



К раствору 3-(5-бром-1-оксо-изоиндолин-2-ил)пиперидин-2,6-диона (80 г, 248 ммоль) в сухом диоксане (20 мл) добавляли трибутилстаннилметанол (87 г, 272 ммоль), реакционную смесь перемешивали при 25°C, и к смеси добавляли тетраakis(трифенилфосфин)палладий (0) (28,6 г, 24,8 ммоль) в атмосфере азота. Реакционную смесь перемешивали при 100°C в течение 16 ч. ЖХ-МС показала, что реакция завершена. Реакционную смесь концентрировали и промывали дихлорметаном/метанолом (10:1, 250 мл x 2) с получением 3-[5-(гидроксиметил)-1-оксо-изоиндолин-2-ил]пиперидин-2,6-диона (62 г, 91,3% выход) в виде коричневого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆): δ 10,96 (s, 1H), 7,64 (d, *J* = 8,0 Гц, 1H), 7,52 (s, 1H), 7,42 (d, *J* = 7,6 Гц, 1H), 5,73

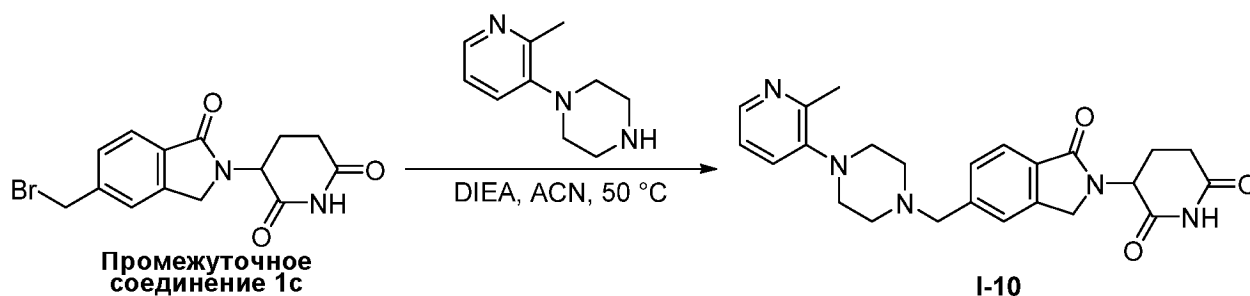
(s, 1H), 5,10-5,06 (m, 1H), 4,59 (d, $J = 6,0$ Гц, 2H), 4,35 (dd, $J = 17,2$ Гц, 54 Гц, 2H), 2,91-2,85 (m, 1H), 2,59-2,55 (m, 1H), 2,38-2,35 (m, 1H), 2,02-1,99 (m, 1H).

[000131] Синтез соединения 1c



К суспензии 3-[5-(гидроксиметил)-1-оксо-изоиндолин-2-ил]пиперидин-2,6-диона (62 г, 226 ммоль) в дихлорметане (1,5 л) добавляли сульфонила бромид (70,5 г, 339 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 18°C в течение 16 ч. ВЭЖХ показала, что реакция завершена. Реакционную смесь фильтровали, твердое вещество промывали метанолом (150 мл x 2) с получением 3-[5-(бромметил)-1-оксо-изоиндолин-2-ил]пиперидин-2,6-диона (45,0 г, 59,0% выход) в виде светло-коричневого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO-}d_6$): δ 10,97 (s, 1H), 7,70-7,66 (m, 2H), 7,56 (d, $J = 8,0$ Гц, 1H), 5,10-5,06 (m, 1H), 4,80 (s, 2H), 4,36 (dd, $J = 54$ Гц, 17,2 Гц, 2H), 2,91-2,85 (m, 1H), 2,59-2,49 (m, 1H), 2,47-2,35 (m, 1H), 2,00-1,98 (m, 1H).

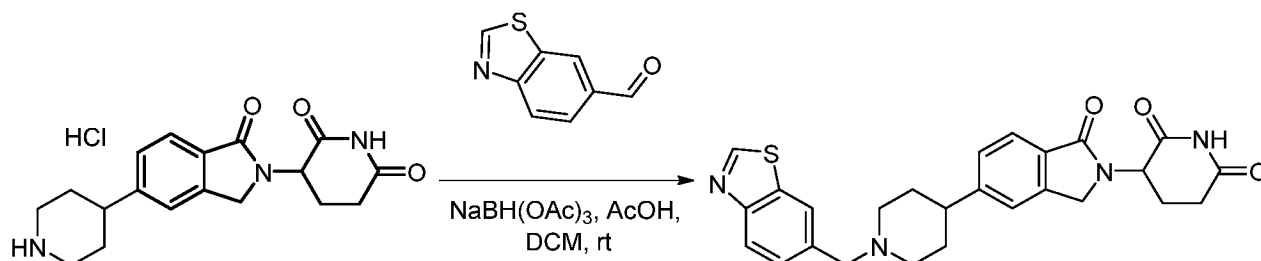
7.14. Пример 14: Синтез 3-(5-((4-(2-метилпиридин-3-ил)пиперазин-1-ил)метил)-1-оксоизоиндолин-2-ил)пиперидин-2,6-диона (Соединение С)



[000132] К перемешанному раствору 3-[5-(бромметил)-1-оксо-изоиндолин-2-ил]пиперидин-2,6-диона (400 мг, 1,2 ммоль) в MeCN (ACN) (5 мл) добавляли 1-(2-метил-3-пиридил)пиперазин (315 мг, 1,8 ммоль) и DIEA (460 мг, 3,6 ммоль). Смесь перемешивали при 50°C в течение 3 ч. Ход реакции контролировали с помощью ЖХ-МС. Смесь концентрировали, и остаток очищали с помощью препаративной ВЭЖХ с получением 3-[5-[[4-(2-метил-3-пиридил)пиперазин-1-ил]метил]-1-оксо-изоиндолин-2-ил]пиперидин-2,6-диона (187,9 мг, 34% выход) в виде серого твердого вещества. Аналитическая ЖХ-МС (Способ 1): МС $[\text{M}+\text{H}^+]$ 434,2. ^1H ЯМР (400 МГц, Метанол- d_4): δ 8,40 (d, $J = 5,5$ Гц, 1H), 8,18 (d, $J = 8,2$ Гц, 1H), 7,93 (d, $J = 7,8$ Гц, 1H), 7,83 - 7,76 (m, 2H), 7,72 (d, $J = 7,6$ Гц, 1H),

5,23 - 5,12 (m, 1H), 4,90 - 4,80 (m, 4H), 4,65 - 4,50 (m, 4H), 3,54 (s, 4H), 2,98 - 2,85 (m, 1H), 2,84 - 2,75 (m, 1H), 2,74 (s, 3H), 2,60 - 2,44 (m, 1H), 2,24 - 2,14 (m, 1H).

7.15. Пример 15: Синтез 3-[5-[1-(1,3-бензотиазол-6-илметил)-4-пиперидил]-1-оксо-изоиндолин-2-ил]пиперидин-2,6-диона (Соединение D)



[000133] К перемешанному раствору 3-[1-оксо-5-(4-пиперидил)изоиндолин-2-ил]пиперидин-2,6-диона гидрохлорида (1,5 г, 4,12 ммоль) в DCM (20 мл) добавляли 1,3-бензотиазол-6-карбальдегид (1,35 г, 8,25 ммоль) и $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (2,62 г, 12,37 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Смесь концентрировали и очищали с помощью препаративной ВЭЖХ с получением 3-[5-[1-(1,3-бензотиазол-6-илметил)-4-пиперидил]-1-оксо-изоиндолин-2-ил]пиперидин-2,6-диона (968,9 мг, 2,0233 ммоль, 49,076% выход) в виде белого твердого вещества. ЖХ-МС: 475,1 $[\text{M}+1]^+$. ^1H ЯМР (300 МГц, Метанол- d_4): δ 9,40 (s, 1H), 8,33 (s, 1H), 8,22 (d, $J = 8,4$ Гц, 1H), 7,81-7,71 (m, 2H), 7,55-7,36 (m, 2H), 5,24-5,09 (m, 1H), 4,62-4,39 (m, 4H), 3,76-3,62 (m, 2H), 3,33-3,19 (m, 2H), 3,13-2,99 (m, 1H), 2,95-2,73 (m, 2H), 2,60-2,38 (m, 1H), 2,24-1,95 (m, 5H).

7.16. Пример 16: Селективность Соединения А, Соединения В, Соединения С и Соединения D

[000134] Клетки множественной миеломы DF15, стабильно экспрессирующие меченные ePL Aiolos, Ikaros или GSPT1, и клетки MDS-L, стабильно экспрессирующие меченные ePL СК1а, были получены посредством лентивирусной инфекции pLOC-ePL-Aiolos (или Ikaros, GSPT1 или СК1а). Клетки множественной миеломы DF15, экспрессирующие Ikaros, Aiolos и GSPT1, слитые с меткой ePL (DiscoverX), и клетки MDS-L, экспрессирующие СК1а, слитые с меткой ePL, распределяли в 384-луночный планшет (Corning, номер по каталогу 3570), предварительно засеянный соединениями (Соединение А, Соединение В, Соединение С и Соединение D). Соединения распределяли с помощью акустического дозатора (акустическая система переноса ATS от EDC Biosystems) в 384-луночный планшет по 10-точечной кривой зависимости от дозы с применением 3-кратных разведений, начиная с 10 мкМ и заканчивая 0,0005 мкМ. Затем в лунку распределяли 25 мкл среды (RPMI-1640 + 10% инактивированной нагреванием FBS + 25 мМ Hepes + 1 мМ

пирувата натрия + 1 x NEAA + 1 x Pen Strep Glutamine), содержащей 5000 клеток DF15 или MSD-L. Планшеты для анализа инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение 4 часов, за исключением 20 часов для GSPT1. После инкубации в каждую лунку добавляли по 25 мкл рабочего раствора реагента для обнаружения InCELL Hunter (DiscoverX, номер по каталогу 96-0002, Fremont, CA) и инкубировали при комнатной температуре в течение 60 минут в защищенном от света месте. Через 60 мин люминесценцию считывали на люминесцентном ридере Envision или PHERAstar.

[000135] Для Helios была сконструирована стабильная клеточная линия Jurkat с применением CRISPR/Cas9 для вставки внутрирамочной метки HiBit в карбокси-концевую рамку считывания гена IKZF2. Тестируемые соединения переносили в планшеты с 1536 лунками с применением акустического дозатора, и клетки Jurkat/Helios/HiBit в DMEM/10% FCS высевали по 10000 клеток/лунку в конечном объеме 5 мкл. Клетки инкубировали при 37°C, относительной влажности 95% в течение 18 часов. Активность люциферазы измеряли путем добавления 2 мкл/лунка реагента Nano-Glo (Promega), инкубирования при комнатной температуре в течение 30 минут и считывания люминесценции на ридере для микротитровальных планшетов.

[000136] Для определения значения EC₅₀ соединения для деградации данного субстрата (концентрация соединения, которая достигает половины максимальной наблюдаемой деградации), применяли четырехпараметрическую логистическую модель (сигмоидальная модель зависимости доза-эффект) ($FIT = (A + \{(B - A) / (1 + [(C/x)^D])\})$) где C представляет собой точку перегиба (EC₅₀), D представляет собой коэффициент корреляции, и A и B представляют собой нижний и верхний пределы аппроксимации, соответственно). Все кривые деградации субстрата были обработаны и оценены с применением ActivityBase (IDBS), пакета программного обеспечения для аналитической обработки данных. Y_{min} представляет собой минимальный процент оставшегося белка.

[000137] Результаты представлены в Таблицах 2-5.

Таблица 2: Соединение A

Дегрон	Y _{мин} (%)	EC ₅₀ (мкМ)
Q1F	NA	NA
Helios	1,5	0,0018
Aiolos	2,7	0,0064
Ikaros	3,2	0,022
GSPT1	91	0,039
CK1a	50	0,19

Таблица 3: Соединение В

Дегрон	Y _{мин} (%)	EC50 (мкМ)
Q1F (из Таблицы 1)	1,7	0,0048
Helios	65	>10
Aiolos	93	>10
Ikaros	91	>10
GSPT1	72	0,054
СК1а	82	>10

Таблица 4: Соединение С

Дегрон	Y _{мин} (%)	EC50 (мкМ)
Q1F (из Таблицы 1)	12	0,023
Helios	86	>10
Aiolos	83	>10
Ikaros	92	>10
GSPT1	89	>10
СК1а	98	>10

Таблица 5: Соединение D

Дегрон	Y _{мин} (%)	EC50 (мкМ)
Q1F (из Таблицы 1)	4,2	0,0007
Helios	24	0,46
Aiolos	87	>10
Ikaros	93	>10
GSPT1	96	>10
СК1а	81	>10

[000138] Как показано в Таблице 2, Соединение А подвергало деградации Helios, Aiolos и Ikaros при EC50 0,022 мкМ или ниже. Соединение А также в значительной степени подвергало деградации СК1а. Напротив, Соединение В подвергало деградации Q1F дегрон при EC50 менее 5 нМ в анализе Jurkat, описанном в Примере 5. Хотя Соединение В проявляло некоторую деградационную активность против Helios, EC50 составляла >10 мкМ, что более чем на 3 порядка выше, чем EC50 для Q1F дегрона (Табл. 3). Соединение В также продемонстрировало некоторую деградационную активность в отношении GSPT1

(Таблица 3). Соединение С являлось высокоселективным в отношении Q1F дегрона в анализе Jurkat, описанном в Примере 5, при EC50 менее 25 нМ (Таблица 4). Соединение D также являлось селективным в отношении Q1F дегрона в анализе Jurkat, описанном в Примере 5, при EC50 менее 1 нМ (Таблица 5), хотя оно также демонстрировало некоторую деградацию Helios при EC50 0,46 мкМ (Таблица 5).

ЭКВИВАЛЕНТЫ

[000139] Настоящее изобретение не ограничено в объеме конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Действительно, из приведенного выше описания специалистам в данной области техники станут очевидными различные модификации предмета изобретения, представленного в настоящем документе, в дополнение к описанным. Предполагается, что такие модификации попадают в объем прилагаемой формулы изобретения.

[000140] В настоящем документе цитируются различные публикации, патенты и заявки на патенты, описания которых полностью включены посредством ссылки.

Таблица некоторых последовательностей

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
1	Консенсусный X1F G-мотив 1	FCX ₁ X ₂ CGX ₃ X ₄
2	Консенсусный X1F G-мотив 2	FCX ₁ X ₂ CGX ₃ X ₄ X ₅
3	IKZF1 ZNF2 Q1F G-мотив	FCNQCGAS
4	IKZF1 ZNF2 Q1F	GERPFFCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHS
5	Консенсусная IKZF1 ZNF2_ZNF3 Q1F	GERPFFCX ₁ X ₂ C GX ₃ X ₄ X ₅ TQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCHLCNY ACRRRDALTG HLRTHS
66	Консенсусная IKZF2 ZNF2_ZNF3 Q1F	GERPFFCX ₁ X ₂ C GX ₃ X ₄ X ₅ TQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCPFCY ACRRRDALTG HLRTHS
67	Консенсусная IKZF3 ZNF2_ZNF3 Q1F	GERPFFCX ₁ X ₂ C GX ₃ X ₄ X ₅ TQKGNL LRHIKLHTGE KPFKCHLCNY ACQRRDALTG HLRTHS
68	Консенсусная IKZF4 ZNF2_ZNF3 Q1F	GERPFFCX ₁ X ₂ C GX ₃ X ₄ X ₅ TQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCPFCNY ACRRRDALTG HLRTHS
6	IKZF1 ZNF2_ZNF3	GERPFQCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCHLCNY ACRRRDALTG HLRTHS
63	IKZF2 ZNF2_ZNF3	GERPFHCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCPFCY ACRRRDALTG HLRTHS
64	IKZF3 ZNF2_ZNF3	GERPFQCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHTGE KPFKCHLCNY ACQRRDALTG HLRTHS
65	IKZF4 ZNF2_ZNF3	GERPFHCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCPFCNY ACRRRDALTG HLRTHS
7	IKZF1 ZNF2_ZNF3 Q1F	GERPFFCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCHLCNY ACRRRDALTG HLRTHS
69	IKZF2 ZNF2_ZNF3 Q1F	GERPFFCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCPFCY ACRRRDALTG HLRTHS
70	IKZF3 ZNF2_ZNF3 Q1F	GERPFFCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHTGE KPFKCHLCNY ACQRRDALTG HLRTHS
71	IKZF4 ZNF2_ZNF3 Q1F	GERPFFCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCPFCNY ACRRRDALTG HLRTHS
8	IKZF1 ZNF1_ZNF2 нуклеотидная последовательность	ggcattcgac ttcctaacgg aaaactaaag tgtgatct gtgggatcat ttgcatcggg cccaatgtgc tcatggttca caaaagaagc cacactGGAG AACGGCCCTT CCAGTGCAAT CAGTGCGGGG CCTCATTCAC CCAGAAGGGC AACCTGCTCC GGCACATCAA GCTGCATTCC
9	IKZF1 ZNF1_ZNF2	GIRLPNGKLK CDICGIICIG PNVLMVHKRS HTGERPFQCN QCGASFTQKG NLLRHIKLHS
10	IKZF1 ZNF1_ZNF2_ZNF3 нуклеотидная последовательность	ggcattcgac ttcctaacgg aaaactaaag tgtgatct gtgggatcat ttgcatcggg cccaatgtgc tcatggttca caaaagaagc cacactGGAG AACGGCCCTT CCAGTGCAAT CAGTGCGGGG CCTCATTCAC CCAGAAGGGC AACCTGCTCC GGCACATCAA GCTGCATTCC ggggagaagc ctttcaaagc ccacctctgc aactacgct gccgcccggag ggacgccctc actggccacc tgaggacgca ctcc
11	IKZF1 ZNF1_ZNF2_ZNF3	GIRLPNGKLK CDICGIICIG PNVLMVHKRS HTGERPFQCN QCGASFTQKG NLLRHIKLHS GEKPFKCHLC NYACRRRDAL TGHLRTHS
12	IKZF1 ZNF2_ZNF3 нуклеотидная последовательность	GGAGAACGGC CCTTCCAGTG CAATCAGTGC GGGGCCTCAT TCACCCAGAA GGGCAACCTG CTCCGGCACA TCAAGCTGCA TTCCggggag aagcccttca aatgccacct ctgcaactac

		gcctgccgcc ggagggacgc cctcactggc cacctgagga cgcactcc
13	IKZF1 ZNF2_ZNF3	GERPFQCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCHLCNY ACRRRDALTG HLRTHS
14	IKZF1 ZNF2 нуклеотидная последовательность	GGAGAACGGC CCTTCCAGTG CAATCAGTGC GGGGCCTCAT TCACCCAGAA GGGCAACCTG CTCCGGCACA TCAAGCTGCA TTCC
15	IKZF1 ZNF2	GERPFQCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHS
60	IKZF2 ZNF2	GERPFHCNQC GASFTQKGNLLRHIKLHS
61	IKZF3 ZNF2	GERPFQCNQC GASFTQKGNLLRHIKLHT
62	IKZF4 ZNF2	GERPFHCNQC GASFTQKGNLLRHIKLHS
16	IKZF1 ZNF2_ZNF3 G6N нуклеотидная последовательность	GGAGAACGGC CCTTCCAGTG CAATCAGTGC aacGCCTCAT TCACCCAGAA GGGCAACCTG CTCCGGCACA TCAAGCTGCA TTCCggggag aagcccttca aatgccacct ctgcaactac gcctgccgcc ggagggacgc cctcactggc cacctgagga cgcactcc
17	IKZF1 ZNF2_ZNF3 G6N	GERPFQCNQC NASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCHLCNY ACRRRDALTG HLRTHS
18	IKZF1 ZNF2_ZNF3 Q1F нуклеотидная последовательность	ggagaacggc ccttcttctg caatcagtgc ggggcctcat tcacccagaa gggcaacctg ctccggcaca tcaagctgca ttccggggag aagcccttca aatgccacct ctgcaactac gcctgccgcc ggagggacgc cctcactggc cacctgagga cgcactcc
19	IKZF1 ZNF2_ZNF3 Q1F	GERPFFCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCHLCNY ACRRRDALTG HLRTHS
59	IKZF1 ZNF2_ZNF3 Q1F/G6N	GERPFFCNQC NASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCHLCNY ACRRRDALTG HLRTHS
20	IKZF1 ZNF1 (аминокислоты 117- 139)	LKCDICGIICIGPNVLMVHKRSH
21	IKZF1 ZNF2 (аминокислоты 145- 167)	FQCNQC GASFTQKGNLLRHIKLH
22	IKZF1 ZNF3 (аминокислоты 173- 195)	FKCHLCNYACRRRDALTGHLRTH
23	IKZF1 ZNF4 (аминокислоты 201- 224)	HKCGYCGRSYKQRSSLEENKERCH
24	IKZF1 ZNF5 (аминокислоты 462- 484)	YKCEHCRVFLDHVMTIHMGC
25	IKZF1 ZNF6 (аминокислоты 490- 514)	FECNMCGYHSQDRYEFSSHITRGEN
26	IKZF2 ZNF1 (аминокислоты 112- 134)	LKCDVCGMVICIGPNVLMVHKRSH
27	IKZF2 ZNF2 (аминокислоты 140- 162)	FHCNQC GASFTQKGNLLRHIKLH
28	IKZF2 ZNF3 (аминокислоты 168- 190)	FKCPFCSYACRRRDALTGHLRTH
29	IKZF2 ZNF4 (аминокислоты 196- 219)	HKCNFCGRSYKQRSSLEENKERCH
30	IKZF2 ZNF5 (аминокислоты 471- 493)	FKCEHCRVFLDHVMTIHMGC
58	IKZF2 ZNF6 (аминокислоты 499- 523)	LECNICGYRSQDRYEFSSHIVRGEN
31	IKZF3 ZNF1 (аминокислоты 118- 140)	MNCDVCGLSICISFNVLMVHKRSH

32	IKZF3 ZNF2 (аминокислоты 146-168)	FQCNQCGASFTQKGNLLRHIKLN
33	IKZF3 ZNF3 (аминокислоты 174-196)	FKCHLCNYACQRRDALTGHLRTH
34	IKZF3 ZNF4 (аминокислоты 202-224)	YKCEFCGRSYKQRSSLEEHKERC
35	IKZF3 ZNF5 (аминокислоты 452-474)	YRCDHCRVFLFDYVMFTIHMGCN
36	IKZF3 ZNF6 (аминокислоты 480-504)	FECNMCGRSHDRYEFSSHIARGEH
37	IKZF4 ZNF1 (аминокислоты 159-181)	LKCDVCGMVCI GPNVLMVHKRSH
38	IKZF4 ZNF2 (аминокислоты 187-209)	FHCNQCGASFTQKGNLLRHIKLN
39	IKZF4 ZNF3 (аминокислоты 215-237)	FKCPFCNYACRRRDALTGHLRTH
40	IKZF4 ZNF4 (аминокислоты 248-271)	YKCNFCGRSYKQOSTLEEHKERCH
41	IKZF4 ZNF5 (аминокислоты 530-552)	FKCEHCRILFLDHVMFTIHMGCN
42	IKZF4 ZNF6 (аминокислоты 558-582)	FECNICGYHSQDRYEFSSHIVRGEH
43	IKZF5 ZNF1 (аминокислоты 82-104)	LKCRYCNYASKGTARLIEHIRIH
44	IKZF5 ZNF2 (аминокислоты 110-132)	HRCHLCPFASAYERHLEAHMRSH
45	IKZF5 ZNF3 (аминокислоты 138-161)	YKCELCSEFRCSDRSNLSHRRRKH
46	IKZF5 ZNF4 (аминокислоты 364-386)	HNCQHCDMYFADNILYTIHMGCN
47	IKZF5 ZNF5 (аминокислоты 392-416)	FQCNICGCKCKNKYDFACHFARGQH
48	Аминокислотная последовательность Ikaros человека	MDADEGQDMS QVSGKESPPV SDTPDEGDEP MPIPEDLSTT SGGQSSKSD RVVASNVKVE TQSDENGRACEMNGEECAE DLRMLDASGE KMNGSHRDQG SSALSGVGGI RLPNGKLNKCD ICGIICIGPN VLMVHKRSHT GERPFQCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCHLCNY ACRRRDALTG HLRTHSVGKP HKCGYCGRSY KQRSSLEEHK ERCHNYLESM GLPGTLYPVI KEETNHSEMA EDLCKIGSER SLVLDRLASN VAKRKSSMPQ KFLGDKGLSD TPYDSSASYE KENEMMKSHV MDQAINNAIN YLGAESLRPL VQTPPGGSEV VPVISPMYQL HKPLAEGTPR SNHSAQDSAV ENLLLLSKAK LVPSEREASP SNSCQDSTDT ESNNEEQRSGLIYLTNHIAP HARNGLSLKE EHRAYDLLRA ASENSQDALR VVSTSGEQMK VYKCEHCRVL FLDHVMYTIH MGCHGFRDPF ECNMCYHSQ DRYEFSSHIT RGEHRFHMS
49	Аминокислотная последовательность Aiolos человека	MEDIQTNAEL KSTQEQSVPA ESAAVLNDYS LTKSHEMENV DSGEGPANED EDIGDSSMKV KDEYSERDEN VLKSEPMGNA EEPEIPYSYS REYNEYENIK LERHVVSFDS SRPTSGKMNC DVCGLSCISF NVLMVHKRSH TGERPFQCNQ

		CGASFTQKGN LLRHIKLHTG EKPFKCHLCN YACQRRDALT GHLRTHSVEK PYKCEFCGRS YKQRSSLEEH KERCRTFLQS TDPGDTASAE ARHIKAEMGS ERALVLDRLA SNVAKRKSSM PQKFIGEKRH CFDVNYNSSY MYEKESELIQ TRMMDQAINN AISYLGAEAL RPLVQTPPAP TSEMVPVISS MYPIALTRAE MSNGAPQELE KCSIHLPEKS VPSEGLSPN NSGHDSTDTD SNHEERQNH YQONHMLVSR ARNGMPLLKE VPRSYELLKP PPICPRDSVK VINKEGEVMD VYRCDHCRVL FLDYVMFTIH MGCHGFRDPF ECNMCGRSH DRYEFSSHIA RGEHRALLK
50	Аминокислотная последовательность Helios человека	METEAIIDGYI TCDNELSPER EHSNMAIDL SSTPNGQHAS PSHMTSTNSV KLEMQSDEEC DRKPLSREDE IRGHDEGSSL EEPLIESSEV ADNRKVQELQ GEGGIRLPNG KCLKDVCGMV CIGPNVLMVH KRSHTGERPF HCNQCGASFT QKGNLLRHIK LHSGEKPFKC PFCSYACRRR DALTGHLRTH SVGKPHKCN CGRSYKQRSS LEEKKERCHN YLQNVSMEEA GQVMSHHVPP MEDCKEQEPI MDNNISLVPF ERPAVIEKLT GNMGKRKSST PQKFVGEKLM RFSYPDIHFD MNLTYEKEAE LMQSHMMDQA INNAITYLGA EALHPLMQHP PSTIAEVAPV ISSAYSQVYH PNRIERPISR ETADSHENNM DGPISLIRPK SRPQEREASP SNSCLDSTDS ESSHDDHQSY QGH PALNPKR KQSPAYMKED VKALDTTKAP KGS LKDIYKV FNGEGEQIRA FKCEHCRVLF LDHVMYTIHM GCHGYRDPLE CNICGYRSQD RYEFSSHIVR GEHTFH
51	Аминокислотная последовательность Eos человека	MHTPPALPRR FQGGGRV RTP GSHRQKDNL ERDPGGCVP DFLPQAQDSN HFIMESLFCF SSGDSSLEKE FLGAPVGPSV STPNSQHSSP SRSLANSIK VEMYSDEESS RLLGPDERRLL EKDDSVIVED SLSEPLGYCD GSGPEPHSPG GIRLPNGKLK CDVCGMVCIG PNVLMVHKRS HTGERPFHCN QCGASFTQKG NLLRHIKLHS GEKPFKCPFC NYACRRRDAL TGHLRTHSVS SPTVGKPYKC NYCGRSYKQQ STLEEHKERC HNYLQSLSTE AQALAGQPGD EIRDLEMVPD SMLHSSSERP TFIDRLANSL TKRKRSTPQK FVGEKQMRFS LSDLPYDVNS GGYEKDVELV AHHSLEPGFG SSLAFVGAEH LRPLRLPPTN CISELTPVIS SVYTQMQPLP GRLELPGSRE AGEGPELDAD GGPLYRPRG PLTDPGASPS NGCQDSTDTE SNHEDRVAGV VSLPQGPPPQ PPPTIVVGRH SPAYAKEDPK PQEGLLRGTP GPSKEVLRVV GESGEPVKAF KCEHCRIFL DHVMFTIHMG CHGFRDPFEC NICGYHSQDR YEFSSHIVRG EHKVG
52	Аминокислотная последовательность Pegasus человека	MGEKKPEPLD FVKDFQEYLT QQTHHVNMI GSVSGDKEAE ALQGAGTDGD QNGLDHPSVE VSLDENS GML VDG FERTFDG KCLKRYCN SKGTARLIEH IRIHTGEKPH RCHLCPFASA YERHLEAHMR SHTGEKPYKC ELCSFRCSDR SNLSHRRRK HKMVPIKGTR SSLSSKKMWG VLQKKT SNLG YSRRALINLS PPSMVVQKPD YLNDFTHEIP NIQTDSYESM AKTTPGTGLP RDPQELMVDN PLNQLSTLAG QLSSLPPENQ NPASPDV VPC PDEKPFMIQQ PSTQAVVSAV SASIPQSSSP TSPEPRPSHS QRNYSPVAGP SSEPSAHTST PSIGNSQPST PAPALPVQDP

		QLLHHCQHCD MYFADNILYT IHMGCHGYEN PFQCNICGCK CKNKYDFACH FARGQHNQH
53	CAR CD19 CD28TM 41BB CD3z	DIQMTQTT SLSASLGDR VTISCRASQD ISKYLNWYQQ KPDGTVKLLI YHTSRLHSGV PSRFSGSGSG TDYSLTISNL EQEDIATYFC QQGNTLPYTF GGGTKLEITG STSGSGKPGS GEGSTKGEVK LQESGPGLVA PSQSLSVTCT VSGVSLPDYG VSWIRQPPRK GLEWLGVIWG SETTYYNSAL KSRLTIKDN SKSQVFLKMN SLQTDDETAIY YCAKHYYGG SYAMYWGQG TSVTVSSESK YGPPCPPCPM FWLVVVGGV LACYSLLVTV AFIIFWVKRG RKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQ EEDGCSCRFP EEEEGGCELR VKFSRSADAP AYQQGQNQLY NELNLGRREE YDVLDKRRGR DPEMGGKPRR KNPQEGLYNE LQKDKMAEAY SEIGMKGERR RGKGDGLYQ GLSTATKDTY DALHMQALPP RGGGEGRGS LTCGDVEENP G
54	CD28TM 41BB CD3z ZNF2	DIQMTQTT SLSASLGDR VTISCRASQD ISKYLNWYQQ KPDGTVKLLI YHTSRLHSGV PSRFSGSGSG TDYSLTISNL EQEDIATYFC QQGNTLPYTF GGGTKLEITG STSGSGKPGS GEGSTKGEVK LQESGPGLVA PSQSLSVTCT VSGVSLPDYG VSWIRQPPRK GLEWLGVIWG SETTYYNSAL KSRLTIKDN SKSQVFLKMN SLQTDDETAIY YCAKHYYGG SYAMYWGQG TSVTVSSESK YGPPCPPCPM FWLVVVGGV LACYSLLVTV AFIIFWVKRG RKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQ EEDGCSCRFP EEEEGGCELR VKFSRSADAP AYQQGQNQLY NELNLGRREE YDVLDKRRGR DPEMGGKPRR KNPQEGLYNE LQKDKMAEAY SEIGMKGERR RGKGDGLYQ GLSTATKDTY DALHMQALPP RTGERPFQCN QCGASFTQKG NLLRHIKLS GGGGEGRGSLL TCGDVEENPG
55	CD28TM 41BB CD3z ZNF1_2	DIQMTQTT SLSASLGDR VTISCRASQD ISKYLNWYQQ KPDGTVKLLI YHTSRLHSGV PSRFSGSGSG TDYSLTISNL EQEDIATYFC QQGNTLPYTF GGGTKLEITG STSGSGKPGS GEGSTKGEVK LQESGPGLVA PSQSLSVTCT VSGVSLPDYG VSWIRQPPRK GLEWLGVIWG SETTYYNSAL KSRLTIKDN SKSQVFLKMN SLQTDDETAIY YCAKHYYGG SYAMYWGQG TSVTVSSESK YGPPCPPCPM FWLVVVGGV LACYSLLVTV AFIIFWVKRG RKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQ EEDGCSCRFP EEEEGGCELR VKFSRSADAP AYQQGQNQLY NELNLGRREE YDVLDKRRGR DPEMGGKPRR KNPQEGLYNE LQKDKMAEAY SEIGMKGERR RGKGDGLYQ GLSTATKDTY DALHMQALPP RGIRLPNGKL KCDICGIICI GPNVLMVHKR SHTGERPFQC NCCGASFTQK GNLLRHIKLS GGGGEGRGSLL LTCGDVEENP G
56	CD28TM 41BB CD3z ZNF2_3	DIQMTQTT SLSASLGDR VTISCRASQD ISKYLNWYQQ KPDGTVKLLI YHTSRLHSGV PSRFSGSGSG TDYSLTISNL EQEDIATYFC

		QQGNTLPYTF GGGTKLEITG STSGSGKPGS GEGSTKGEVK LQESGPGLVA PSQSLSVTCT VSGVSLPDYG VSWIRQPPRK GLEWLGVIWG SETTYYNSAL KSRLTIKDN SKSQVFLKMN SLQTDDTAIY YCAKHYYYGG SYAMDYWGQG TSVTVSSESK YGPPCPPCPM FWVLVVVGGV LACYSLLVTV AFIIFWVKRG RKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQ EEDGCSCRFP EEEEEGGCEL VKFSRSADAP AYQQGQNQLY NELNLGRREE YDVLDKRRGR DPEMGGKPRR KNPQEGLYNE LQKDKMAEAY SEIGMKGERR RGKGDGLYQ GLSTATKDTY DALHMQALPP RGERPFQCNQ CGASFTQKGN LLRHIKLSHG EKPFKCHLCN YACRRRDALT GHLRTHSGGG EGRGSLTTCG DVEENPG
57	CD28TM 41BB CD3z ZNF1_2_3	DIQMTQTT SLSASLGDR VTISCRASQD ISKYLNWYQQ KPDGTVKLLI YHTSRLHSGV PSRFSGSGSG TDYSLTISNL EQEDIATYFC QQGNTLPYTF GGGTKLEITG STSGSGKPGS GEGSTKGEVK LQESGPGLVA PSQSLSVTCT VSGVSLPDYG VSWIRQPPRK GLEWLGVIWG SETTYYNSAL KSRLTIKDN SKSQVFLKMN SLQTDDTAIY YCAKHYYYGG SYAMDYWGQG TSVTVSSESK YGPPCPPCPM FWVLVVVGGV LACYSLLVTV AFIIFWVKRG RKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQ EEDGCSCRFP EEEEEGGCEL VKFSRSADAP AYQQGQNQLY NELNLGRREE YDVLDKRRGR DPEMGGKPRR KNPQEGLYNE LQKDKMAEAY SEIGMKGERR RGKGDGLYQ GLSTATKDTY DALHMQALPP RGIRLPNGKL KCDICGIICI GPNVLMVHKR SHTGERPFQC NQCGASFTQK GNLLRHIKLSHG SGEKPFKCHL CNYACRRRDA LTGHLRTHSG GGEGRGSLLT CGDVEENPG
72	Q9UKT9 IKZF3 146 168 23	FQCNQCGASFTQKGNLLRHIKLSHG
73	Q66K89 E4F1 220 242 23	HECKLCGASFRTKGSILRHRRH
74	Q6ZMY9 ZN517 205 227 23	FQCTECGKAFKQSSILLRHQLIH
75	Q6DD87 ZN787 178 200 23	FVCPRCGRGFSQPKSLARHLRLH
76	Q6ZMY9 ZN517 396 418 23	FECAECGKAFGRKSNLTLHQKIH
77	Q96JP5 ZFP91 400 422 23	LQCEICGFTRQKASLNWHMCKH
78	Q6DD87 ZN787 150 172 23	YTCPDCGRSFTQSKSLAKHRRSH
79	Q96CK0 ZN653 528 550 23	FTCETCGKSFKRKNHLEVHRRTH
80	Q17R98 ZN827 817 839 23	FPCDVCGKVFRQQTLSRHLSLH
81	Q6DD87 ZN787 317 339 23	HICVECGEGFVQGAALRRHKKIH
82	Q6DD87 ZN787 66 88 23	YICNECGKSFHWSKLTRHQORTH
83	Q6ZMY9 ZN517 233 255 23	FQCGECGKAFRQSTQLAAHHRVH
84	Q96CK0 ZN653 556 578 23	LQCEICGYQCRQRASLNWHMCKH
85	Q9BU19 ZN692 417 439 23	LQCEICGFTRQKASLNWHQRKH
86	Q6ZMY9 ZN517 317 339 23	YRCLRCGQRFIRGSSLLKHHRLH
87	Q6ZMY9 ZN517 261 283 23	YACGECGKAFRSSRLLQHOKFH
88	Q8IZM8 ZN654 25 47 23	FACVICGRKFRNRGLMQKHLKNH
89	Q17R98 ZN827 374 396 23	FQCPICGLVIKRSYWKRMVH
90	Q6ZMY9 ZN517 368 390 23	HECPVCGRPFRRHNSLLLHLRLH
91	Q8N554 ZN276 496 518 23	YICDECGQTFKQRKHLVHQMRH
92	Q66K89 E4F1 463 485 23	FACAQCGKAFPKAYLLKKHQEVH
93	Q6ZMY9 ZN517 424 446 23	FACTECGKAFRRSYTLNEHYRLH

94	Q96NG8 ZN582 339 361 23	YECKECGKAFNQGSTLIRHQRIH
95	Q8N554 ZN276 524 546 23	LQCEVCGFQCRQRASLKYHMTKH
96	Q6DD87 ZN787 94 116 23	NACADCGKTFSQSSHLVQHRRIH
97	Q6DD87 ZN787 122 144 23	YACLECGKRFSWSSNLMQHQRH
98	Q6ZMY9 ZN517 289 311 23	FACTECGKAFRRFTLNEHGRIH
99	Q96NG8 ZN582 283 305 23	YQCKECGKAFNRISHLKVHYRIH
100	Q96NG8 ZN582 395 417 23	YQCKVCGRAFKRVSHTLVHYRIH
101	Q6ZMY9 ZN517 452 474 23	YRCRACGRACSRSLSTLIQHQKVH
102	Q9UKT9 IKZF3 118 140 23	MNCDVCGLSGISFNVL MVHKRSH
103	Q96NG8 ZN582 367 389 23	YECKVCGKAFRVSSQLKQHQRH
104	Q96NG8 ZN582 311 333 23	YACKECGKTFSHRSQLIQHQT VH
105	Q96NG8 ZN582 423 445 23	YECKECGKAFSHCSQLIHHQVIH
106	Q96NG8 ZN582 199 221 23	YKCKECGKAFKYGSRLIQHENIH
107	Q96NG8 ZN582 227 249 23	YECKECGKAFNSGNSFIQHQRVH
108	Q66K89 E4F1 491 513 23	FRCGDCGKLYKTIAHVGRHRRVH
109	Q66K89 E4F1 519 541 23	YPCPKCGKRYKTKNAQQVHFRTH

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Сконструированный полипептид, содержащий домен деградации, при этом домен деградации содержит аминокислотную последовательность FCX₁X₂CGX₃X₄ (SEQ ID NO: 1), где:

X₁ выбран из аспарагина, аспартата, глицина, глутамина, метионина, гистидина, триптофана, изолейцина, аргинина, лейцина, валина, треонина и фенилаланина,

X₂ выбран из глутамина, аргинина, гистидина, лейцина, фенилаланина, тирозина, триптофана, изолейцина, валина и метионина,

X₃ выбран из и аланина, серина, цистеина, аргинина, лейцина, изолейцина, метионина и глицина, и

X₄ выбран из серина, метионина, лизина, изолейцина, валина, гистидина, глутамина, аргинина, фенилаланина и триптофана.

2. Сконструированный полипептид по п. 1, где:

X₁ выбран из аспарагина, глутамина, метионина, гистидина, триптофана, изолейцина, аргинина, лейцина, валина, треонина и фенилаланина,

X₂ выбран из глутамина, аргинина, гистидина, лейцина, фенилаланина, тирозина, триптофана, изолейцина и метионина,

X₃ выбран из аланина, серина, цистеина и глицина, и

X₄ выбран из серина, метионина, гистидина, глутамина, аргинина, фенилаланина и триптофана.

3. Сконструированный полипептид по п. 1 или п. 2, где домен деградации содержит аминокислотную последовательность FCX₁X₂CGX₃X₄X₅ (SEQ ID NO: 2), где

X₃ выбран из фенилаланина, триптофана, метионина, аргинина, гистидина, лейцина, тирозина, цистеина и глутамина.

4. Сконструированный полипептид по п. 3, где X₅ выбран из фенилаланина, триптофана, метионина, аргинина, гистидина, лейцина, тирозина и глутамина.

5. Сконструированный полипептид по п. 3 или п. 4, где X₅ выбран из фенилаланина, триптофана, метионина, лейцина, тирозина и глутамина.

6. Сконструированный полипептид по п. 3, где X₅ представляет собой фенилаланин.

7. Сконструированный полипептид по любому из п.п. 1-6, где X₁ представляет собой аспарагин.

8. Сконструированный полипептид по любому из п.п. 1-7, где X₂ представляет собой глутамин.

9. Сконструированный полипептид по любому из п.п. 1-8, где X_3 представляет собой аланин или серин.
10. Сконструированный полипептид по п. 9, где X_3 представляет собой аланин.
11. Сконструированный полипептид по любому из п.п. 1-10, где X_4 представляет собой серин.
12. Сконструированный полипептид по п. 1, где домен деградации содержит аминокислотную последовательность FCNQCAS (SEQ ID NO: 3).
13. Сконструированный полипептид по любому из п.п. 1-12, где домен деградации содержит, по меньшей мере, один домен типа «цинковые пальцы».
14. Сконструированный полипептид по п. 13, где домен деградации содержит два домена типа «цинковые пальцы».
15. Сконструированный полипептид по любому из п.п. 1-13, где, по меньшей мере, один или каждый домен типа «цинковые пальцы» независимо содержит аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90% или, по меньшей мере, на 95% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 20-47 и 58.
16. Сконструированный полипептид по любому из п.п. 1-15, где домен деградации содержит аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90% или, по меньшей мере, на 95% идентична цинковому пальцу 2 (ZNF2) Ikaros, Helios, Aiolos или Eos человека.
17. Сконструированный полипептид по п. 16, где домен деградации содержит второй домен типа «цинковые пальцы», где второй домен типа «цинковые пальцы», по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90% или, по меньшей мере, на 95% идентичен домену типа «цинковые пальцы» 1 (ZNF1) или ZNF3 Ikaros, Helios, Aiolos или Eos человека.
18. Сконструированный полипептид по любому из п.п. 1-17, где домен деградации содержит аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90% или, по меньшей мере, на 95% идентична цинковому пальцу 2 (ZNF2) и цинковому пальцу 3 (ZNF3) Ikaros, Helios, Aiolos или Eos человека.
19. Сконструированный полипептид по любому из п.п. 1-18, где домен деградации содержит аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90% или, по меньшей мере, на 95% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 21, 27, 32 и 38.
20. Сконструированный полипептид по любому из п.п. 1-19, где домен деградации содержит аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 85%, по

меньшей мере, на 90% или, по меньшей мере, на 95% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 15, 60, 61 и 62.

21. Сконструированный полипептид по любому из п.п. 1-20, где домен деградации содержит аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90% или, по меньшей мере, на 95% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 6, 63, 64 и 65.

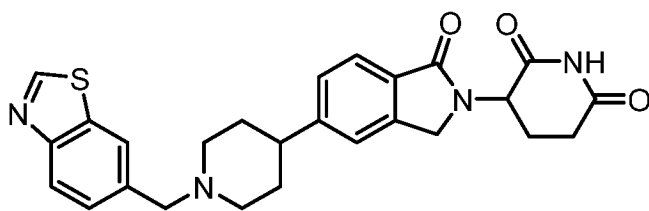
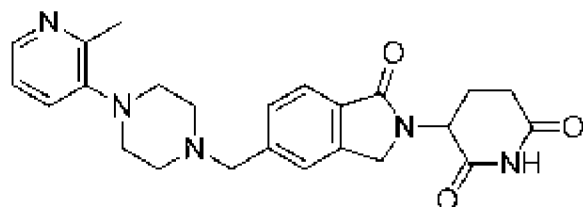
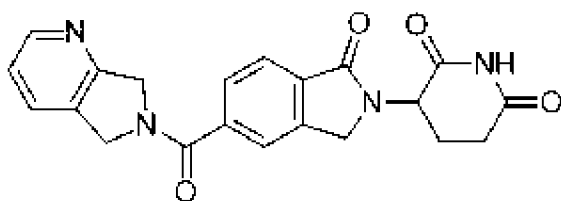
22. Сконструированный полипептид по любому из п.п. 1-21, где домен деградации содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:
 GERPFFCX₁X₂CGX₃X₄X₅TQKGNLLRHIKLSGEEKPFKCHLCNYACRRRDALTGHLRTHS
 (SEQ ID NO: 5);
 GERPFFCX₁X₂CGX₃X₄X₅TQKGNLLRHIKLSGEEKPFKCPFCSYACRRRDALTGHLRTHS
 (SEQ ID NO: 66);
 GERPFFCX₁X₂CGX₃X₄X₅TQKGNLLRHIKLHTGEEKPFKCHLCNYACQRRDALTGHLRTHS
 (SEQ ID NO: 67) и
 GERPFFCX₁X₂CGX₃X₄X₅TQKGNLLRHIKLSGEEKPFKCPFCNYACRRRDALTGHLRTHS
 (SEQ ID NO: 68).

23. Сконструированный полипептид по любому из п.п. 1-22, где домен деградации содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:
 GERPFFCNQCGASFTQKGNLLRHIKLSGEEKPFKCHLCNYACRRRDALTGHLRTHS
 (SEQ ID NO: 7);
 GERPFFCNQCGASFTQKGNLLRHIKLSGEEKPFKCPFCSYACRRRDALTGHLRTHS (SEQ
 ID NO: 69);
 GERPFFCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHTGEEKPFKCHLCNYACQRRDALTGHLRTHS
 (SEQ ID NO: 70) и
 GERPFFCNQCGASFTQKGNLLRHIKLSGEEKPFKCPFCNYACRRRDALTGHLRTHS
 (SEQ ID NO: 71).

24. Сконструированный полипептид по любому из п.п. 1-23, где сконструированный полипептид убиквитинируется в присутствии агента деградации, при этом агент деградации представляет собой малую молекулу, которая связывается с доменом деградации.

25. Сконструированный полипептид по любому из п.п. 1-24, где сконструированный полипептид подвергается деградации в присутствии агента деградации, при этом агент деградации представляет собой малую молекулу, которая связывается с доменом деградации.

26. Сконструированный полипептид по п. 24 или п. 25, где агент деградации также связывается с цереблном.
27. Сконструированный полипептид по п. 26, где агент деградации опосредует комплекс, включающий домен деградации, агент деградации и цереблон.
28. Сконструированный полипептид по любому из п.п. 24-27, где агент деградации представляет собой соединение, выбранное из:



и его таутомеры, фармацевтически приемлемые соли и фармацевтически приемлемые соли его таутомеров.

29. Сконструированный полипептид по любому из п.п. 24-28, где сконструированный полипептид убиквитинируется и/или подвергается деградации в клетке в присутствии агента деградации.
30. Сконструированный полипептид по п. 29, где клетка находится *in vitro*.
31. Сконструированный полипептид по п. 29, где клетка находится *in vivo*.
32. Сконструированный полипептид по любому из п.п. 1-31, где сконструированный полипептид является по существу цитоплазматическим или ядерным в клетке, или где сконструированный полипептид содержит трансмембранный домен.
33. Сконструированный полипептид по любому из п.п. 1-32, где домен деградации слит с эндогенным белком или расположен в нем.
34. Сконструированный полипептид по п. 33, где эндогенный белок представляет собой белок млекопитающих.

35. Сконструированный полипептид по п. 33, где эндогенный белок представляет собой белок человека.
36. Сконструированный полипептид по любому из п.п. 33-35, где эндогенный белок представляет собой PRDM1, TGFBR2, CASP8, CBLB, CD5, CISH, CGKA, DGKz, MAP4K1, ARID2, BACH2, CHX37, KLF2, KLF3, KLF6, MAF, SIGLEC9, TOX, ZBTB32, PTPN2, AKT1, PIK3CD, MT1E, MT2A, CSK, ITK, PAG1, PDCD4, ZC3H12A, DNMT1, DNMT3A, PRBM1, STK4, TET2, BNIP3, FAS, CBL, BGAT5, RNF128, STK17B, TRIB1, TXNIP, UBASH3A, BATF, FLI1, IKZF1, IKZF2, IRF4, NFATC1, NR4A1, MAP2K1, MAP2K2, MAP4K4, PPARGC1A, RELB, TMEM173, USP10, MT1A, члены семейства PP2A, RASA2, NR4A2, NR4A3, AHR, CD70, LHALS1, SOCS1, SOCS2, SOCS3, TAZ, USP21 или YAP1.
37. Сконструированный полипептид по любому из п.п. 33-36, где биологическая активность эндогенного белка по существу сохраняется в сконструированном полипептиде.
38. Сконструированный полипептид по любому из п.п. 1-37, отличающийся тем, что сконструированный полипептид содержит трансмембранный домен.
39. Сконструированный полипептид по п. 38, где трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен белка, выбранного из альфа-цепи Т-клеточного рецептора, бета-цепи Т-клеточного рецептора, дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3s, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, ICOS, TIM3, LAB3, TIGIT, PD1 или CTLA4.
40. Сконструированный полипептид по п. 38 или п. 39, отличающийся тем, что сконструированный полипептид содержит внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен.
41. Сконструированный полипептид по п. 40, где внеклеточный домен содержит лиганд, лигандсвязывающий домен или антигенсвязывающий домен.
42. Сконструированный полипептид по п. 41, где внеклеточный домен содержит антигенсвязывающий домен.
43. Сконструированный полипептид по п. 42, где антигенсвязывающий домен связывает опухолевый антиген.
44. Сконструированный полипептид по п. 42 или п. 43, где антигенсвязывающий домен связывает антиген, выбранный из 4-1BB, 5T4, 8H9, B7-H6, антигена аденокарциномы, α -фетопротейна, антигена созревания В-клеток (BCMA), BAFFR, В-клеточной лимфомы, антигена C242, CA9, карциноэмбрионального антигена, CA-125, карбоангидразы 9 (CA-IX), CCR4, CD3, CD4, CD19, CD20, CD22, CD23 (IgE рецептора), CD28, CD30 (TFRSF8), CD33, CD38, CD40, CD44v6, CD44v7/8, CD51, CD52, CD56, CD70 CD74, CD80, CD123,

CD152, CD171, CD200, CD221, CE7, CEA, C-MET, CLAUDIN6, CLAUDIN18,3, CNT0888, CTLA-4, DRS, EpCAM, ErbB2, ErbB3/4, EGFR, EGFR γ III, EphA2, EGP2, EGP40, FAP, фетального AchR, дополнительного домена В фибронектина, фолатного рецептора α , фолатного рецептора 1, G250/CAIX, GD2, GD3, гликопротеина 75, GP MB, HER2/neu, HGF, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, HMW-MAA, киназы рецептора фактора рассеяния человека, рецептора IGF-1, IGF-I, IgG1, IL-6, IL-13, рецептора IL-13 α 2, рецептора IL-11 α , рецептора инсулиноподобного фактора роста I, интегрина α 5I31, интегрина α i33, легкой каппа-цепи, L1-CAM, легкой лямбда-цепи, антигена Leu, мезотелина, MORAb-009, MS4A1, MUC1, MUC1 6, муцина CanAg, NCAM, N-гликолилнейраминовой кислоты, лигандов NKG2D, NPC-IC, PDGF-R a, PDL192, фосфатидилсерина, простатспецифического ракового антигена (PSCA), клеток карциномы предстательной железы, PSMA, PSC1, RANKL, RON, ROR1, SCH 900105, SDC1, SLAMF7, spl7, TAG72, тенасцина C, TGF β 2, TGF-I3, TL1A, TRAIL-R1, TRAIL-R2, опухолевого антигена CTAA16.88, UPK1B, VEGF-A, рецепторов VEGF, VEGFR-1, VEGFR2, TEM1, TEM8 и/или виментина.

45. Сконструированный полипептид по любому из п.п. 42-44, где антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи антитела и вариабельную область легкой цепи антитела.

46. Сконструированный полипептид по любому из п.п. 42-45, где антигенсвязывающий домен содержит scFv.

47. Сконструированный полипептид по любому из п.п. 42-44, где антигенсвязывающий домен содержит антигенсвязывающий домен однодоменного антитела.

48. Сконструированный полипептид по любому из п.п. 42-47, где внутриклеточный домен содержит, по меньшей мере, один костимулирующий домен.

49. Сконструированный полипептид по п. 48, где внутриклеточный домен содержит два костимулирующих домена.

50. Сконструированный полипептид по п. 48 или п. 49, где, по меньшей мере, один костимулирующий домен представляет собой костимулирующий домен рецепторного белка, выбранного из 4-1BB (CD137), CD28, OX40, активирующего рецептора К-клеток, BTLA, лиганда Toll-подобного рецептора, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, CDS, ICAM-L LFA-1 (CD1 la/CD18), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), RANK, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, Kp80 (KLRF1), Kp44, Kp30, Kp46, CD 19, CD4, CD8a, CD8p, IL2Rp, IL2Ry, IL7Ra, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD1 ld, ITGAE, CD103, ITGAL, CD1 la, LFA-1, ITGAM, CD1 lb, ITGAX, CD1 lc, ITGB 1, CD29, ITGB2, IL15Ra, IL7R, CD18, CD132, LFA-1, ITGB7, KG2D, KG2C, T FR2, TRANCE/RA KL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile),

CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD 160 (BY55), PSGL1, CD 100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD 150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD 162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, DAP10, DAP 12, лиганда CD83, молекулы МНС класса I, белка рецептора TNF, иммуноглобулинподобного белка, рецептора цитокина, интегрина и/или сигнальной молекулы активации лимфоцитов.

51. Сконструированный полипептид по п. 48 или п. 49, отличающийся тем, что сконструированный полипептид содержит костимулирующий домен 4-1BB.

52. Сконструированный полипептид по любому из п.п. 40-51, где внутриклеточный домен содержит, по меньшей мере, один сигнальный домен.

53. Сконструированный полипептид по п. 52, где, по меньшей мере, один сигнальный домен представляет собой сигнальный домен активирующего мотива иммунорецептора на основе тирозина (ITAM).

54. Сконструированный полипептид по п. 52 или п. 53, где, по меньшей мере, один сигнальный домен представляет собой сигнальный домен рецепторного белка, выбранного из CD3ε, CD3ζ, CD3η, FcRγ, FcRβ, CD3δ, CD3γ, CD5, CD22, CD20, CD79a, CD79b, CD278 (ICOS), FcERI, CD66d, DAP10 и DAP12.

55. Сконструированный полипептид по п. 54, где внутриклеточный домен содержит сигнальный домен CD3ζ.

56. Сконструированный полипептид по любому из п.п. 40-55, отличающийся тем, что сконструированный полипептид содержит от аминоконца до карбоксильного конца (i) внеклеточный домен [ECD] - трансмембранный домен [TM] - костимулирующий домен [CoD] - сигнальный домен [SigD] - домен деградации [DD]; или (2) ECD-TM-CoD-DD-SigD; или (3) ECD-TM-DD-CoD-SigD.

57. Сконструированный полипептид по любому из п.п. 40-56, где сконструированный полипептид представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR).

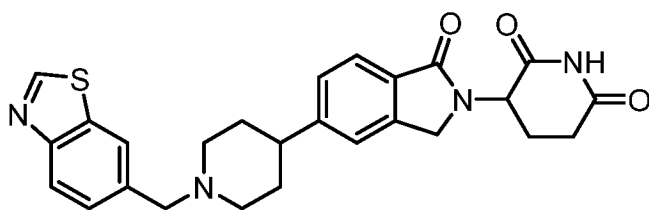
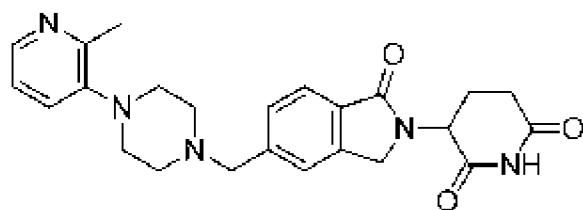
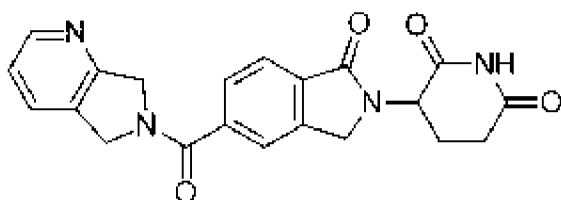
58. Сконструированный полипептид по любому из п.п. 1-57, отличающийся тем, что сконструированный полипептид содержит один или более пептидных линкеров между одним или более доменами.

59. Сконструированный полипептид по любому из п.п. 1-58, где сконструированный полипептид содержится в клетке.

60. Сконструированный полипептид по п. 59, где клетка представляет собой эффекторную клетку человека.

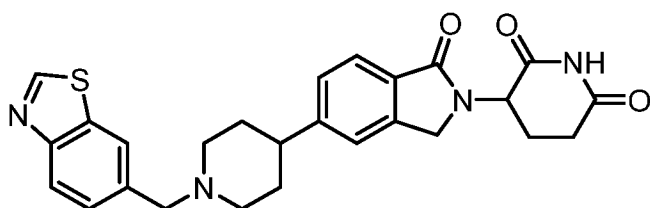
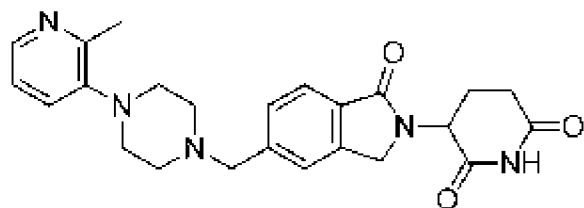
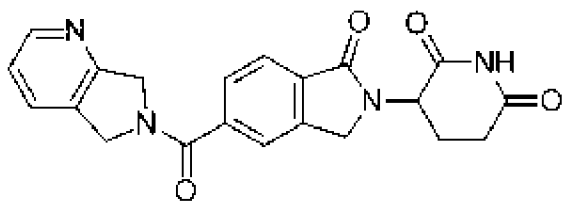
61. Сконструированный полипептид по п. 60, где клетка представляет собой Т-клетку или NK-клетку.

62. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует сконструированный полипептид по любому из п.п. 1-61.
63. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 62.
64. Клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 62 или вектор по п. 63.
65. Клетка, содержащая сконструированный полипептид по любому из п.п. 1-61.
66. Клетка по п. 64 или п. 65, где клетка представляет собой эффекторную клетку человека.
67. Клетка по любому из п.п. 64-66, где клетка представляет собой Т-клетку или НК-клетку.
68. Клетка по п. 67, где клетка представляет собой Т-клетку.
69. Клетка по п. 68, где клетка представляет собой эффекторную Т-клетку.
70. Клетка по п. 68, где клетка представляет собой CD4+ Т-клетку или CD8+ Т-клетку.
71. Фармацевтическая композиция, содержащая клетку по любому из п.п. 64-70.
72. Способ снижения уровня сконструированного полипептида по любому из п.п. 1-61, включающий приведение сконструированного полипептида в контакт с агентом деградации, выбранным из:



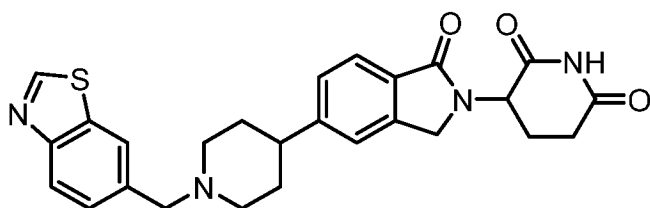
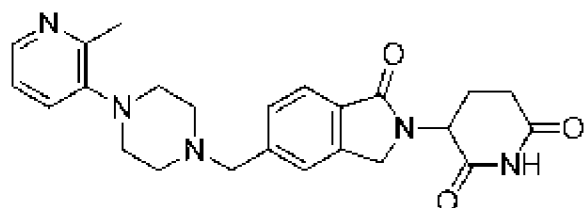
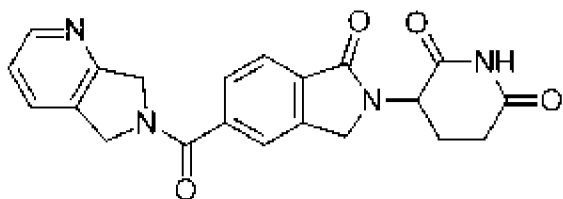
и его таутомеров, его фармацевтически приемлемых солей и его фармацевтически приемлемых солей таутомеров.

73. Способ снижения уровня сконструированного полипептида в клетке, включающий приведение в контакт клетки по любому из п.п. 64-70 с агентом деградации, выбранным из:



и его таутомеров, его фармацевтически приемлемых солей и его фармацевтически приемлемых солей таутомеров.

74. Способ снижения уровня сконструированного полипептида в клетке у субъекта, включающий введение субъекту агента деградации, выбранного из:



и его таутомеров, его фармацевтически приемлемых солей и его фармацевтически приемлемых солей таутомеров, где клетка содержит сконструированный полипептид по любому из п.п. 1-61.

75. Способ по п. 74, где клетка представляет собой эффекторную клетку человека.

76. Способ по п. 74 или п. 75, где клетка представляет собой Т-клетку или НК-клетку.

77. Способ по любому из п.п. 72-76, где сконструированный полипептид убиквитинируется в присутствии агента деградации.

78. Способ по любому из п.п. 72-77, где сконструированный полипептид подвергается деградации в присутствии агента деградации.

79. Способ по любому из п.п. 72-78, где агент деградации связывается с доменом деградации.

80. Способ по любому из п.п. 72-79, где агент деградации также связывается с цереблном.

81. Способ по п. 80, где агент деградации опосредует комплекс, включающий домен деградации, агент деградации и цереблон.

82. Способ лечения заболевания или расстройства у субъекта, включающий введение субъекту клетки по любому из п.п. 64-70.

83. Способ по п. 82, где клетка представляет собой Т-клетку.

84. Способ по п. 83, где клетка представляет собой эффекторную Т-клетку.

85. Способ по п. 83, где клетка представляет собой CD4+ Т-клетку или CD8+ Т-клетку.

86. Способ по любому из п.п. 82-85, отличающийся тем, что клетка содержит сконструированный полипептид по п. 57.

87. Способ по любому из п.п. 82-86, где заболевание или расстройство представляет собой рак.

88. Способ по п. 87, где рак выбран из онкологического заболевания крови или солидного рака.

89. Способ по п. 88, где онкологическое заболевание крови представляет собой острый миелогенный лейкоз (AML), острый лимфобластный лейкоз (ALL), хронический миелогенный лейкоз (СML), лимфому, неходжкинскую лимфому (NHL), болезнь Ходжкина, множественную миелому или миелодиспластический синдром.

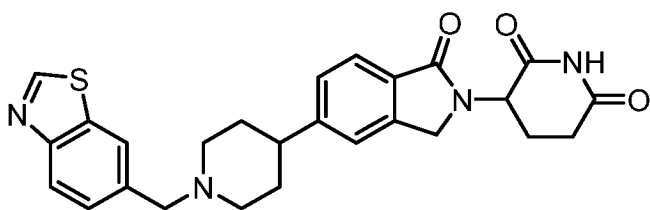
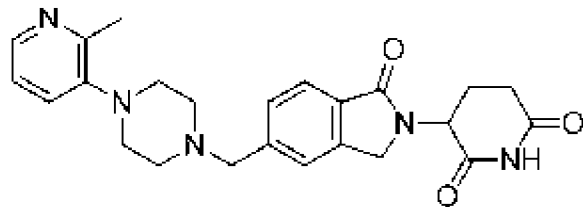
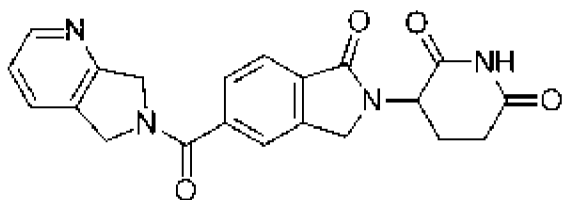
90. Способ по п. 88, где солидный рак представляет собой рак головного мозга, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак легкого, рак толстой кишки, рак матки, рак кожи, рак печени, рак костей, рак поджелудочной железы, рак яичников, рак яичка, рак мочевого пузыря, рак почки, рак головы и шеи, рак желудка, рак шейки матки, рак прямой кишки, рак гортани и рак пищевода.

91. Способ по любому из п.п. 82-90, отличающийся тем, что перед введением клетки субъекту клетка приводится в контакт *ex vivo* с агентом деградации, при этом агент деградации представляет собой малую молекулу, которая связывается с доменом деградации.

92. Способ по любому из п.п. 82-90, включающий введение субъекту клетки с агентом деградации, при этом агент деградации представляет собой малую молекулу, которая связывается с доменом деградации.

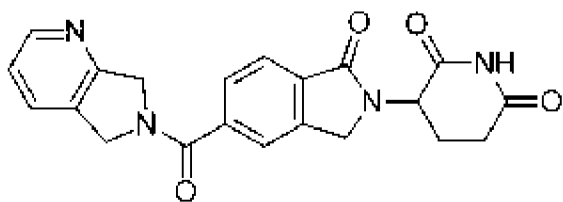
93. Способ по любому из п.п. 82-90, отличающийся тем, что после введения клетки субъекту способ включает введение агента деградации, при этом агент деградации представляет собой малую молекулу, которая связывается с доменом деградации.

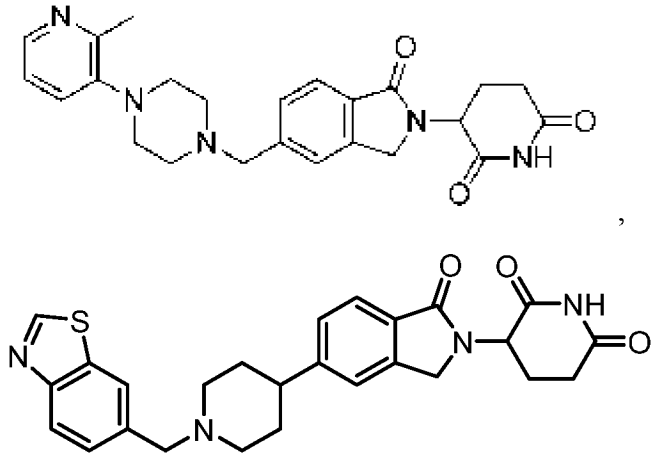
94. Способ по любому из п.п. 91-93, где агент деградации представляет собой соединение, выбранное из:



и его таутомеров, его фармацевтически приемлемых солей и его фармацевтически приемлемых солей таутомеров.

95. Соединение, выбранное из:





и его таутомеров, его фармацевтически приемлемых солей и его фармацевтически приемлемых солей таутомеров.

96. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по п. 95 и, по меньшей мере, один фармацевтически приемлемый носитель.

TITLE	CHN	10	20	30	40	50	60	70	80	90	ID%	SEQ ID No
IKZF1_Ikaros		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	100	48
IKZF1_Aiolos		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	52	49
IKZF1_Helios		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	52	50
IKZF1_Eos		MHTFPALPRRFQGGGRV	TPGSHRQGDNLERDPSGGCV	FDLPQAQDSNHFI	MSLFC	ESSGDS	SLEKEFLGAPVG	PSVSTPNSQHS	SFSRSL	SANSI	49	51
IKZF1_Pegasus		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	22	52

TITLE	CHN	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	ID%	SEQ ID No
IKZF1_Ikaros		KVETQSDEENGR	--ACEMNGE	CAEDLRML	DASGERMNGSHRDQ	GSSALSGVGG	GIRLPNGK	LKCDICG	IICIGPNVLMVHKRSHTGER	PFQCNQCGASF	100	48	
IKZF1_Aiolos		KVKDEYSERDEN	--VLKSEPMGNAE	EEPEIPYSYSREY	NEYENIKLERHVVS	FDSSRPTSGRM	NCIVCGLSCI	SFNVLMVHKRSHTGER	PFQCNQCGASF	52	49		
IKZF1_Helios		KLEMQSDEECDRKPLSRE	DEIRGHDEGSSLEEPL	IESSEVADNRK	VOELQEGG	GIRLPNGK	LKCDVCGMVCIGPNVLMVHKRSHTGER	PFHCNQCGASF	52	50			
IKZF1_Eos		KVEMYSDDESSR	--LLGPDERLLEK	DDSVIVEDSLSEPL	GYCDGSGFEPHSPGG	GIRLPNGK	LKCDVCGMVCIGPNVLMVHKRSHTGER	PFHCNQCGASF	49	51			
IKZF1_Pegasus		SVEVSLDENSGM	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	22	52	

TITLE	CHN	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	ID%	SEQ ID No
IKZF1_Ikaros		TQKGNLLRHIKLSGKEPK	FKCHLCNYACRRRDAL	TGHLRTHS	-----	VGKPHKCGYCGRSYKQR	SSLEE	HKERCHNY	LESMLPGTLY	PVIK	-----	100	48
IKZF1_Aiolos		TQKGNLLRHIKLSGKEPK	FKCHLCNYACRRRDAL	TGHLRTHS	-----	VEKPYKCEFCGRSYKQR	SSLEE	HKERCRTFLQ	STDPGDTAS	AEAR	-----	52	49
IKZF1_Helios		TQKGNLLRHIKLSGKEPK	FKCPFCNYACRRRDAL	TGHLRTHS	-----	VGKPHKCNVCGRSYKQR	SSLEE	HKERCHNY	LQNVSM	EAGQVM	SHHVP	52	50
IKZF1_Eos		TQKGNLLRHIKLSGKEPK	FKCPFCNYACRRRDAL	TGHLRTHSVSSPTV	GKPYKCNVCGRSYKQR	STLEE	HKERCHNY	LQSLSTE	AQALAGQP	-----	GD	49	51
IKZF1_Pegasus		KGTARLI	EHIRIHTGKPHRCHLC	PFASAYERHLEAHMRSHT	-----	GEKPYKCELC	SFRCSDRSNLSH	RRRKH	KMVP	IKGTR	SSLS	22	52

Фиг. 1А

TITLE	CHN	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	ID%	SEQ ID No	
IKZF1_Ikaros		EETNHSEMAEDLCKIGSERSLVLDRLASNVAKRKSSMPQKFLGDRGLSDTPFYDSSA-----SYEKENEMMKSHVMDQAINNAINYLGAESLRPLVQTPP											100	48
IKZF1_Aiolos		-----HIKAEMGSERALVLDRLASNVAKRKSSMPQKFLGDRGLSDTPFYDSSA-----MYEKESELIQTRMMDQAINNAISYLGAEALRPLVQTPP											52	49
IKZF1_Helios		CKEQ@PIMDNNISLVPFERPAVIEKLTGNMGKRKSSSTPQKLVGKELMRFSYPDIHFDMLN-TYEKEAELMDSHMMDQAINNAITYLGAEALHPLMQHPP											52	50
IKZF1_Eos		EIRDLEMVFDMSMLHSSSERPTFI DRLANSLTKRKRSTPQKLVGKELMRFSYSDLPYDVSNGGYEKDVELVAHHSLEPGFGSSLAFVGAEHLRPLRLPPT											49	51
IKZF1_Pegasus		----WGVLQKRTSNLGYRRALINLSPPSMVVQKPDYLNDFTHEIFNIQTDSYESMAKTT-PTGGLPRDPQELMVDNPLNQLSTLAGQLSSLPPENQNP											22	52

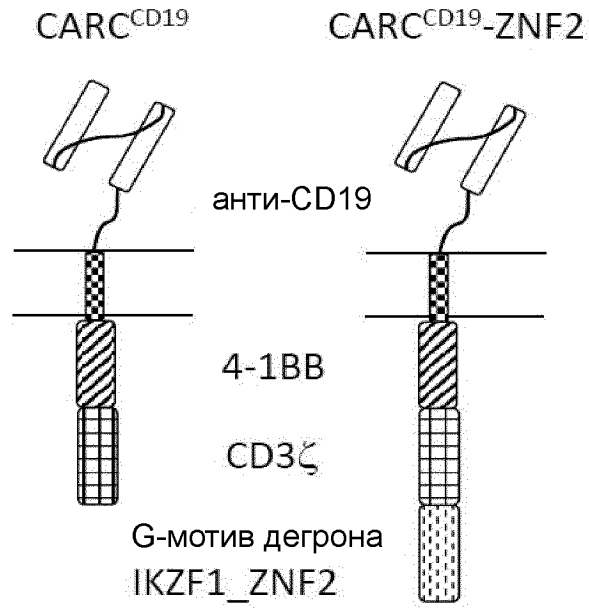
TITLE	CHN	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	ID%	SEQ ID No	
IKZF1_Ikaros		GG-SEVVPVISPMYQLHKP----LAEGTPRSNHSAQDSAVENLLLLSKAKLVPSEREASPSNSCQDSTDTESNNEEQRSGLIYLINHIAPHARNGLS-L											100	48
IKZF1_Aiolos		APTSEMVPVISSMYPIALT-----RAEMSNGAPQELEKKS IHLPEKSVPSERGLSPNNSGHDSTDVDSNHEERQNHLYQONHMVLSRARNGMPLL											52	49
IKZF1_Helios		STIAEVAFVISSAYSQVYH-PNRIERPISRETADSHENMDGPI SLIRPKSRPQEREASPSNSCLDSTDSESSHDDHQSYQGH PALNPKRKQSPAY--M											52	50
IKZF1_Eos		NCISELTFVISSVYTMQPLPGRIELPGSREAGEGPEDLADGGPLLYRPRGPLTDPGASPSNGCQDSTDTESNHEDRVAGVVS L PQGP P P Q P P T I W G											49	51
IKZF1_Pegasus		ASPDVWPCPDEKPFMIQQP-----STQAVVSAVSASIPQSSSP TSP E P R P S H S Q R N Y S F V A G P S S E P S A H T S T P S I G N S Q P S T P A P A L P											22	52

TITLE	CHN	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	ID%	SEQ ID No	
IKZF1_Ikaros		KEEHRAYD-----LLRAASENSQDALRVVSTSGEQKVKYKCEHCRVLF LDHVMYTIHMGCHGFRDPFECNMCGYHSQDRYEFSSHITRGEHRFHMS											100	48
IKZF1_Aiolos		KEVERSYE-----LLKPPPI CPRDSVKVINKEGEVMDVYRCDHCRVLF LDYVMFTI HMGCHGFRDPFECNMCGYRSHDRYEFSSH IARGEHRALLK											52	49
IKZF1_Helios		KEDVKALD-----TTKAPKGS LKDIYKVFNGEGEQIRA FKCEHCRVLF LDHVMYTIHMGCHGYRDPLECNICGYRSQDRYEFSSHIVRGEHTFH--											52	50
IKZF1_Eos		RHSPAYAKEDPKPQEGLLRGTGPGSKEVLRVVGESGEPVKA FKCEHCRILF LDHVMFTI HMGCHGFRDPFECNICGYHSQDRYEFSSHIVRGEHKVG--											49	51
IKZF1_Pegasus		VQDPQLL-----HHCQHCDMYFADNILYTIHMGCHGYENPPQCNICGCKCRNKYDFACHFARGQHNGH--											22	52

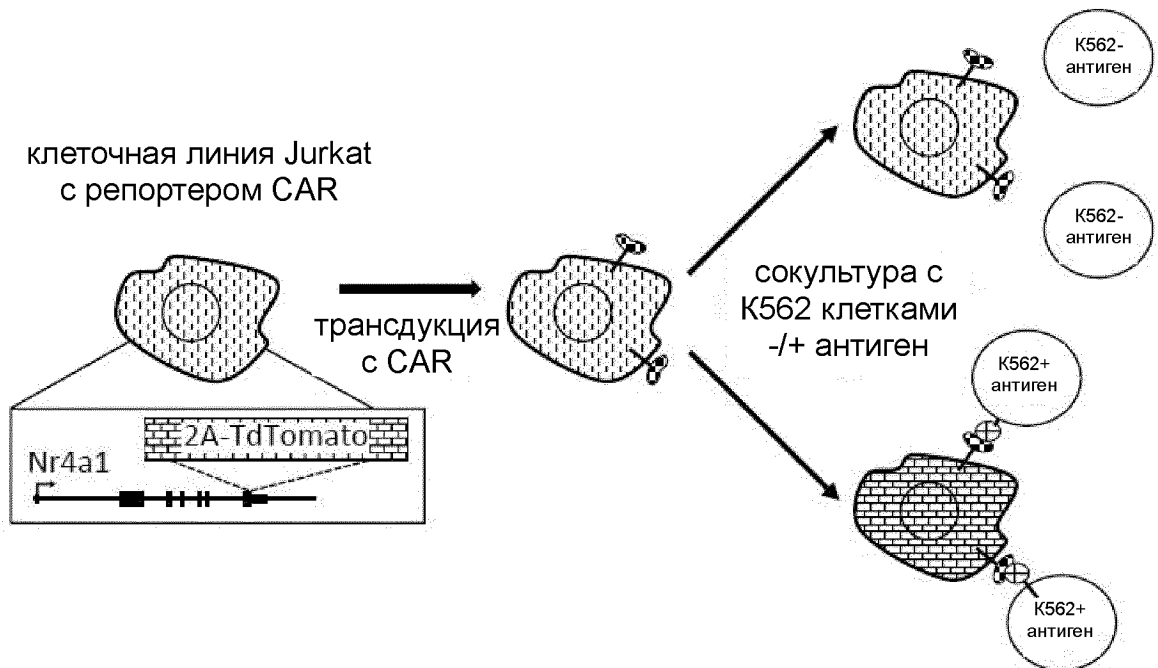
Фиг. 1А (продолжение)

Uniprot	Ген	Белок	Старт	Стоп	Длина	Последовательность	SEQ ID NO
Q13422	IKZF1	Ikaros	117	139	23	LKCDICGIICIGPNVLMVHKRSH	20
Q13422	IKZF1	Ikaros	145	167	23	FQCNQCGASFTQKGNLLRHIKLN	21
Q13422	IKZF1	Ikaros	201	224	24	HKCGYCGRSYKQRSSLEEKKERCH	23
Q13422	IKZF1	Ikaros	490	514	25	FECNMGYHSQDRYEFSSHIIRGEH	25
Q9UKS7	IKZF2	Helios	112	134	23	LKCDVCGMVCIGPNVLMVHKRSH	26
Q9UKS7	IKZF2	Helios	140	162	23	FHCNQCGASFTQKGNLLRHIKLN	27
Q9UKS7	IKZF2	Helios	196	219	24	HKCNVCGRSYKQRSSLEEKKERCH	29
Q9UKS7	IKZF2	Helios	499	523	25	LECNICGYRSQDRYEFSSHIIRGEH	58
Q9UKT9	IKZF3	Aiolos	118	140	23	MNCDVCGLSLCSIFNVLMVHKRSH	31
Q9UKT9	IKZF3	Aiolos	146	168	23	FQCNQCGASFTQKGNLLRHIKLN	32
Q9UKT9	IKZF3	Aiolos	202	224	23	YKCEFCGRSYKQRSSLEEKKERC	34
Q9UKT9	IKZF3	Aiolos	480	504	25	FECNMGYRSHDRYEFSSHIIRGEH	36
Q9H2S9	IKZF4	Eos	159	181	23	LKCDVCGMVCIGPNVLMVHKRSH	37
Q9H2S9	IKZF4	Eos	187	209	23	FHCNQCGASFTQKGNLLRHIKLN	38
Q9H2S9	IKZF4	Eos	248	271	24	YKCNVCGRSYKQOSTLEEKKERCH	40
Q9H2S9	IKZF4	Eos	558	582	25	FECNICGYHSQDRYEFSSHIIRGEH	42
Q9H5V7	IKZF5	Pegasus	392	416	25	FQCNICGCKCKNKYDFACHFARGQH	47

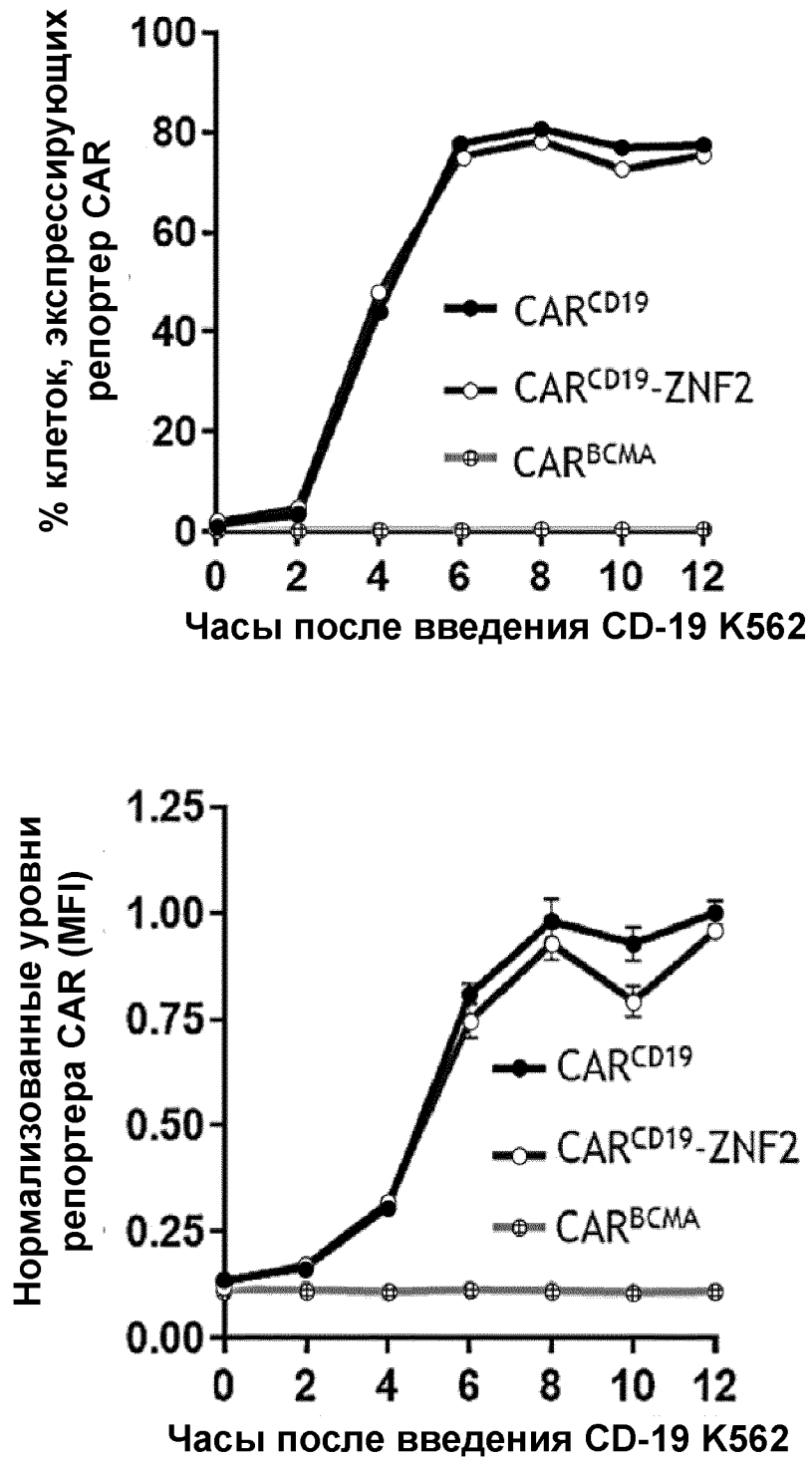
Фиг. 1В



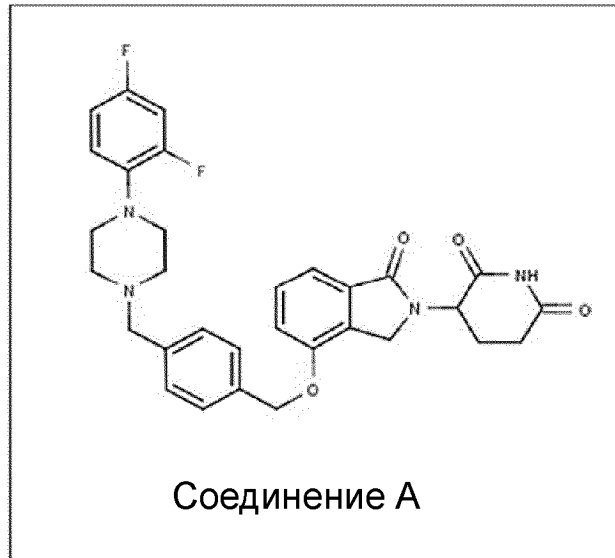
Фиг. 2



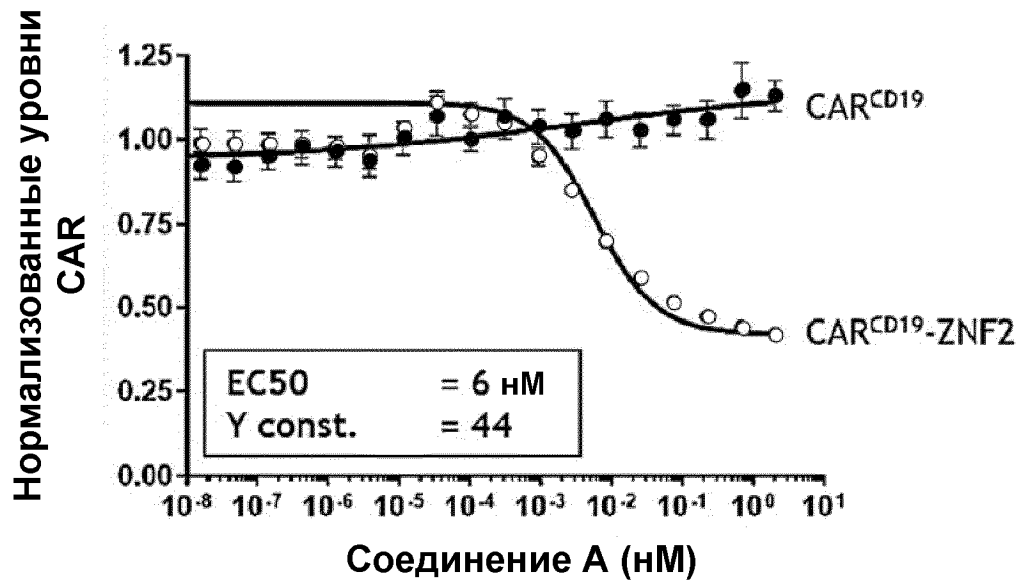
Фиг. 3



Фиг. 4А



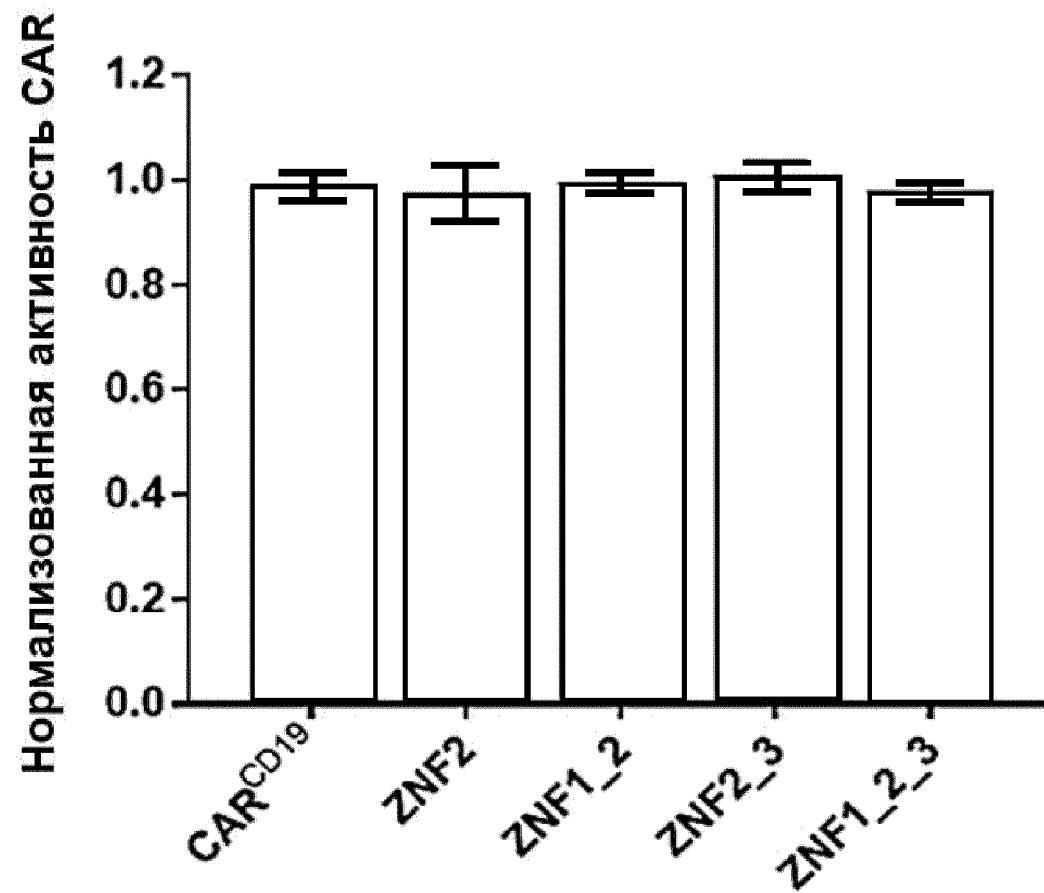
Фиг. 4В



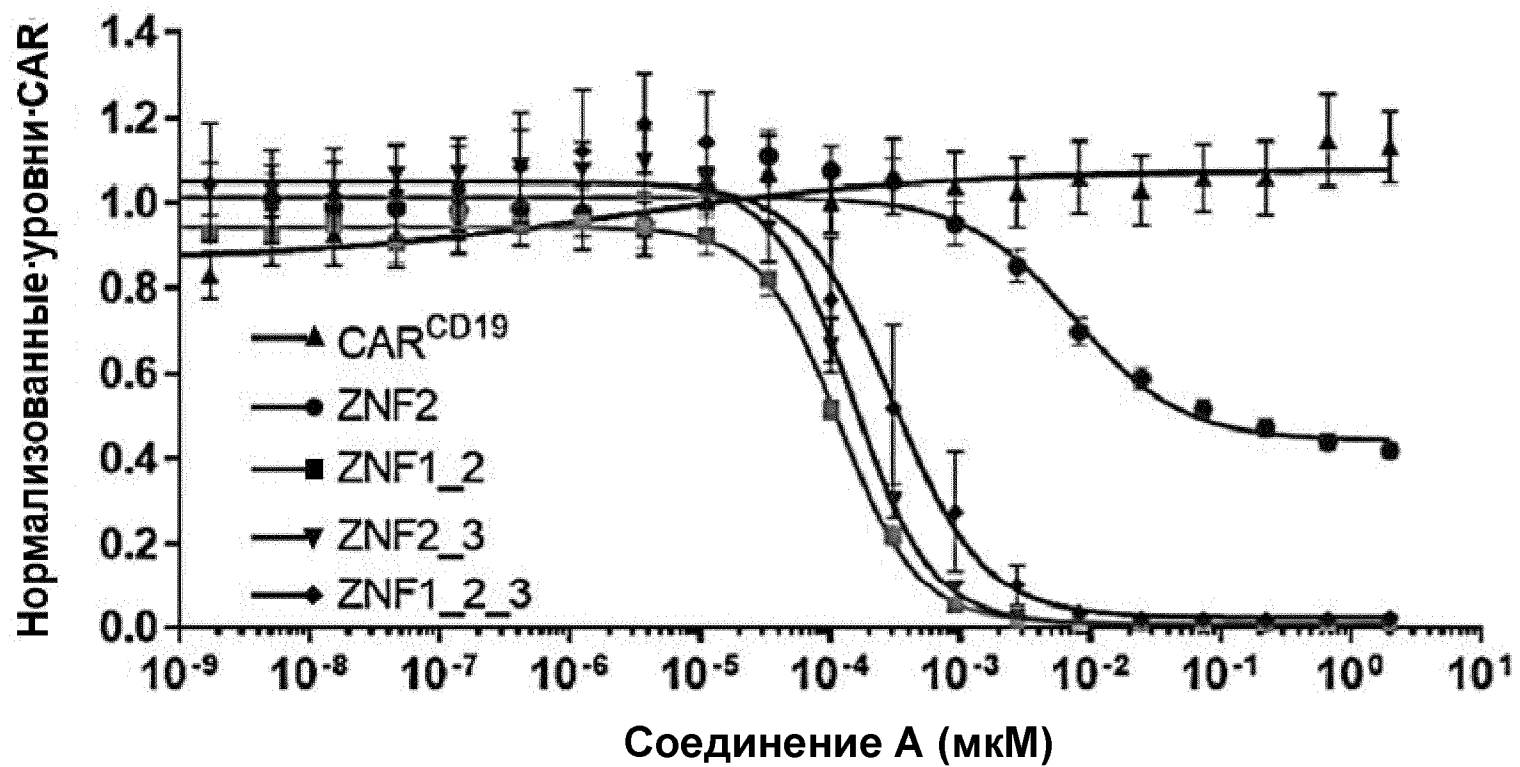
Фиг. 4С

CAR ^{CD19} :	4-1BB	CD3z				Конструкт	IC50 (нМ)	Y const.
ZNF2:	4-1BB	CD3z	2			ZNF2	30	44
ZNF1_2:	4-1BB	CD3z	1	2		ZNF1_2	.12	1
ZNF2_3:	4-1BB	CD3z	2	3		ZNF2_3	.15	.9
ZNF1_2_3:	4-1BB	CD3z	1	2	3	ZNF1_2_3	.30	2.4

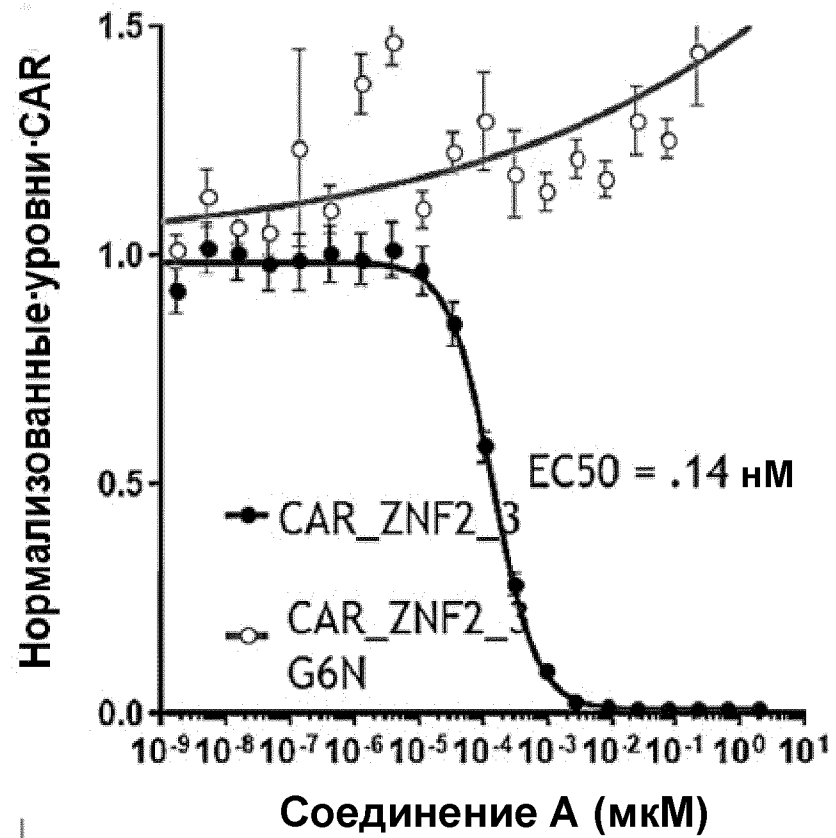
Фиг. 5А



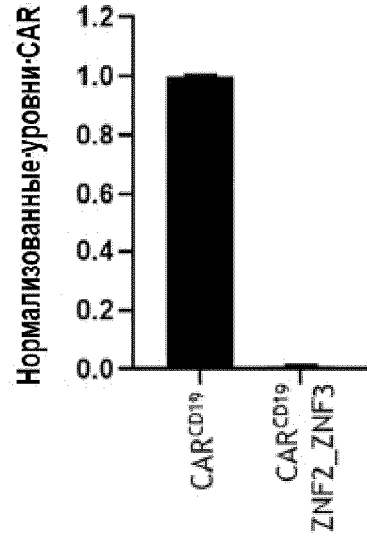
Фиг. 5В



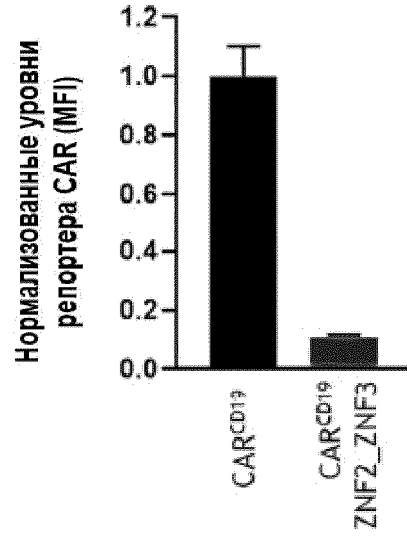
Фиг. 5С



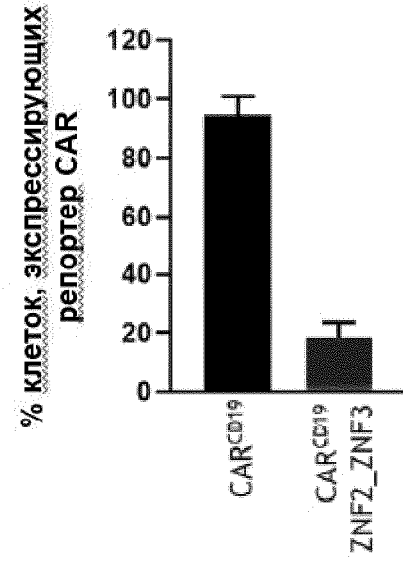
Фиг. 5D



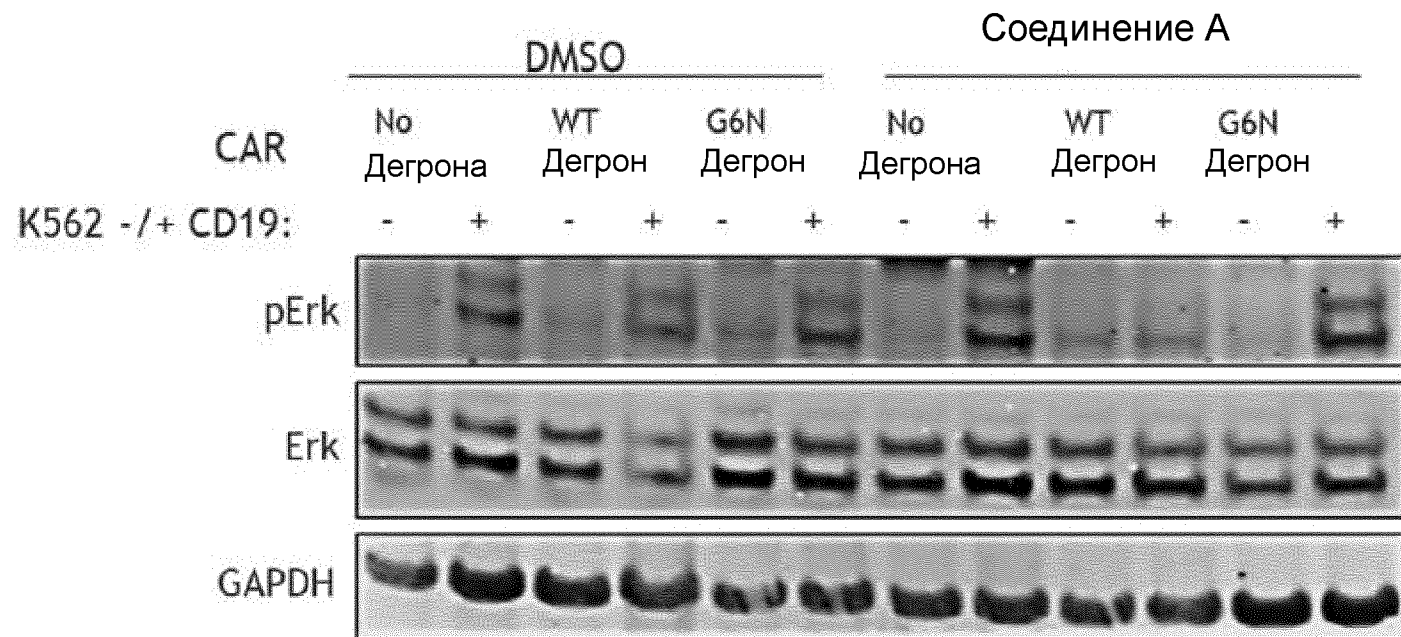
Фиг. 6А



Фиг. 6В



Фиг. 6С



Фиг. 7

Наименование цепи	10										20										ID%	SEQ ID NO					
Символы консенсуса																											
Логотип последовательности																											
Q13422_IKZF1_145_167_23	F	Q	C	N	Q	C	G	A	S	F	T	Q	K	G	N	L	L	R	H	I	K	L	H	.	.	100	21
Q9UKT9_IKZF3_146_168_23	F	Q	C	N	Q	C	G	A	S	F	T	Q	K	G	N	L	L	R	H	I	K	L	H	.	.	100	32
Q9UKT9_IKZF3_140_162_23	F	H	C	N	Q	C	G	A	S	F	T	Q	K	G	N	L	L	R	H	I	K	L	H	.	.	96	27
Q9H2S9_IKZF4_187_209_23	F	H	C	N	Q	C	G	A	S	F	T	Q	K	G	N	L	L	R	H	I	K	L	H	.	.	96	38
Q9H2S9_IKZF4_248_271_24	Y	K	C	N	Y	C	G	R	S	Y	K	Q	Q	S	T	L	E	E	H	K	E	R	C	H	.	35	40
Q9UKS7_IKZF2_196_219_24	H	K	C	N	Y	C	G	R	S	Y	K	Q	R	S	S	L	E	E	H	K	E	R	C	H	.	35	29
Q9H5V7_IKZF5_392_416_25	F	Q	C	N	I	C	G	C	K	C	K	N	K	Y	D	F	A	C	H	F	A	R	G	Q	H	35	47
Q9UKT9_IKZF3_118_140_23	M	N	C	D	V	C	G	L	S	C	I	S	F	N	V	L	M	V	H	K	R	S	H	.	.	30	31
Q13422_IKZF1_201_224_24	H	K	C	G	Y	C	G	R	S	Y	K	Q	R	S	S	L	E	E	H	K	E	R	C	H	.	30	23
Q13422_IKZF1_117_139_23	L	K	C	D	I	C	G	I	I	C	I	G	P	N	V	L	M	V	H	K	R	S	H	.	.	26	20
Q9UKS7_IKZF2_112_134_23	L	K	C	D	V	C	G	M	V	C	I	G	P	N	V	L	M	V	H	K	R	S	H	.	.	26	26
Q9H2SP_IKZF4_159_181_23	L	K	C	D	V	C	G	M	V	C	I	G	P	N	V	L	M	V	H	K	R	S	H	.	.	26	37

Фиг. 8

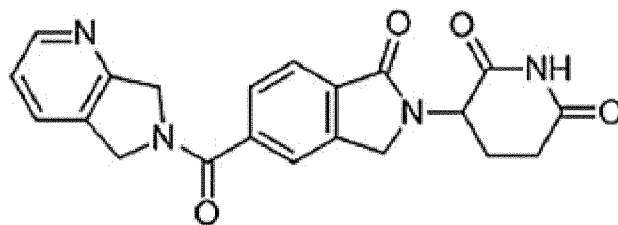
Наименование цепи	10										20										ID%	SEQ ID NO			
Символы консенсуса																									
Логотип последовательности																									
Q9UKT9_IKZF3_146_168_23	F	Q	C	N	Q	C	G	A	S	F	T	Q	K	G	N	L	L	R	H	I	K	L	H	100	72
Q66K89_E4F1_220_242_23	H	E	C	K	L	C	G	A	S	F	R	T	K	G	S	L	L	R	H	H	R	R	H	52	73
Q62MY9_ZN517_205_227_23	F	Q	C	T	E	C	G	K	A	F	K	Q	S	S	I	L	L	R	H	Q	L	I	H	52	74
Q6DD87_ZN787_178_200_23	F	V	C	P	R	C	G	R	G	F	S	Q	P	K	S	L	A	R	H	L	R	L	H	48	75
Q62MY9_ZN517_396_418_23	F	E	C	A	E	C	G	K	A	F	G	R	K	S	N	L	T	L	H	Q	K	I	H	48	76
Q96JP5_ZFP91_400_422_23	L	Q	C	E	I	C	G	F	T	C	R	Q	K	A	S	L	N	W	H	M	K	K	H	43	77
Q6DD87_ZN787_150_172_23	Y	T	C	P	D	C	G	R	S	F	T	Q	K	S	K	S	L	A	K	H	R	R	S	43	78
Q96CK0_ZN653_528_550_23	F	T	C	E	T	C	G	K	S	F	K	R	K	N	H	L	E	V	H	R	R	T	H	43	79
Q17R98_ZN827_817_839_23	F	P	C	D	V	C	G	K	V	F	G	R	Q	Q	T	L	S	R	H	L	S	L	H	43	80
Q6DD87_ZN787_317_339_23	H	I	C	V	E	C	G	E	G	F	V	Q	G	A	A	L	R	R	H	K	K	I	H	43	81
Q6DD87_ZN787_66_88_23	Y	I	C	N	E	C	G	K	S	F	S	H	W	S	K	L	T	R	H	Q	R	T	H	43	82
Q62MY9_ZN517_233_255_23	F	Q	C	G	E	C	G	K	A	F	R	Q	S	T	Q	L	A	A	H	H	R	V	H	43	83
Q96CK0_ZN653_556_578_23	L	Q	C	E	I	C	G	Y	Q	C	R	Q	R	A	S	L	N	W	H	M	K	K	H	39	84
Q98U19_ZN692_417_439_23	L	Q	C	E	I	C	G	F	T	C	R	Q	K	A	S	L	N	W	H	Q	R	K	H	39	85
Q62MY9_ZN517_317_339_23	Y	R	C	L	R	C	G	Q	R	F	I	R	G	S	S	L	L	K	H	H	R	L	H	39	86
Q62MY9_ZN517_261_283_23	Y	A	C	G	E	C	G	K	A	F	S	R	S	S	R	L	L	Q	H	Q	K	F	H	39	87
Q8IZM8_ZN654_25_47_23	F	A	C	V	I	C	G	R	K	F	R	N	R	G	L	M	Q	K	H	L	K	N	H	39	88
Q17R98_ZN827_374_396_23	F	Q	C	P	I	C	G	L	V	I	K	R	K	S	Y	W	K	R	H	M	V	I	H	39	89
Q62MY9_ZN517_368_390_23	H	E	C	P	V	C	G	R	P	F	R	H	N	S	L	L	L	L	H	L	R	L	H	39	90
Q8N554_ZN276_496_518_23	Y	I	C	D	E	C	G	Q	T	F	K	Q	R	K	H	L	L	V	H	Q	M	R	H	39	91
Q66K89_E4F1_463_485_23	F	A	C	A	Q	C	G	K	A	F	P	K	A	Y	L	L	K	K	H	Q	E	V	H	39	92

Фиг. 9

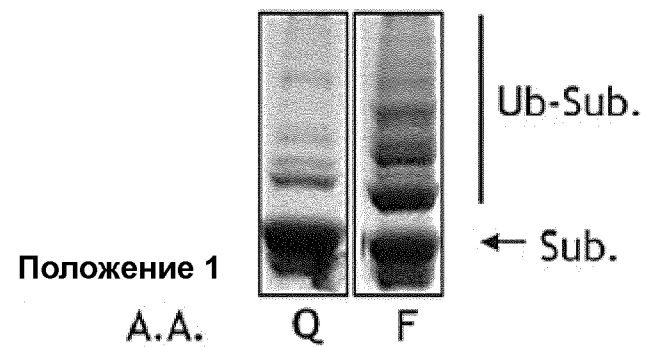
Наименование цепи	10										20										ID%	SEQ ID NO			
Символы консенсуса	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*				
Q6ZMY9_ZN517_424_446_23	F	A	C	T	E	C	G	K	A	F	R	R	S	Y	T	L	N	E	H	Y	R	L	H	39	93
Q96Ng8_ZN582_339_361_23	Y	E	C	K	E	C	G	K	A	F	N	Q	G	S	T	L	I	R	H	Q	R	I	H	39	94
Q8N554_ZN276_524_546_23	L	Q	C	E	V	C	G	F	Q	C	R	Q	R	A	S	L	K	Y	H	M	T	K	H	35	95
Q6DD87_ZN787_94_116_23	N	A	C	A	D	C	G	K	T	F	S	Q	S	S	H	L	V	Q	H	R	R	I	H	35	96
Q6DD87_ZN787_122_144_23	Y	A	C	L	E	C	G	K	R	F	S	W	S	S	N	L	M	Q	H	Q	R	I	H	35	97
Q6ZMY9_ZN517_289_311_23	F	A	C	T	E	C	G	K	A	F	C	R	R	F	T	L	N	E	H	G	R	I	H	35	98
Q96NG8_ZN582_283_305_23	Y	Q	C	K	E	C	G	K	A	F	N	R	I	S	H	L	K	V	H	Y	R	I	H	35	99
Q96NG8_ZN582_395_417_23	Y	Q	C	K	V	C	G	R	A	F	K	R	V	S	H	L	T	V	H	Y	R	I	H	35	100
Q6ZMY9_ZN517_452_474_23	Y	R	C	R	A	C	G	R	A	C	S	R	L	S	T	L	I	Q	H	Q	K	V	H	30	101
Q9UKT9_IKZF3_118_140_23	M	N	C	D	V	C	G	L	S	C	I	S	F	N	V	L	M	V	H	K	R	S	H	30	102
Q96NG8_ZN582_367_389_23	Y	E	C	K	V	C	G	K	A	F	R	V	S	S	Q	L	K	Q	H	Q	R	I	H	30	103
Q96NG8_ZN582_311_333_23	Y	A	C	K	E	C	G	K	T	F	S	H	R	S	Q	L	I	Q	H	Q	T	V	H	30	104
Q96NG8_ZN582_423_445_23	Y	E	C	K	E	C	G	K	A	F	S	H	C	S	Q	L	I	H	H	Q	V	I	H	30	105
Q96NG8_ZN582_199_221_23	Y	K	C	K	E	C	G	K	A	F	K	Y	G	S	R	L	I	Q	H	E	N	I	H	30	106
Q96NG8_ZN582_227_249_2	Y	E	C	K	E	C	G	K	A	F	N	S	G	S	N	F	I	Q	H	Q	R	V	H	30	107
Q66K89_E4F1_491_513_23	F	R	C	G	D	C	G	K	L	Y	K	T	I	A	H	V	R	G	H	R	R	V	H	26	108
Q66K89_E4F1_519_541_23	Y	P	C	P	K	C	G	K	R	Y	K	T	K	N	A	Q	Q	V	H	F	R	T	H	26	109

Фиг. 9 (продолжение)

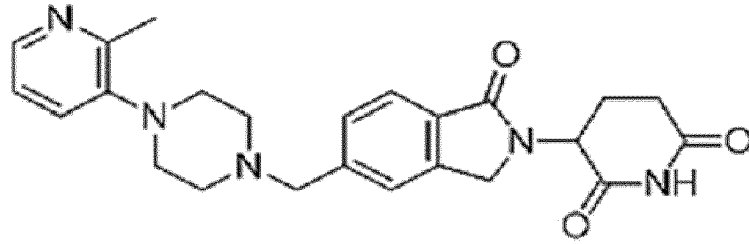
In vitro убиквитинирование Ikaros MBP-ZNF2



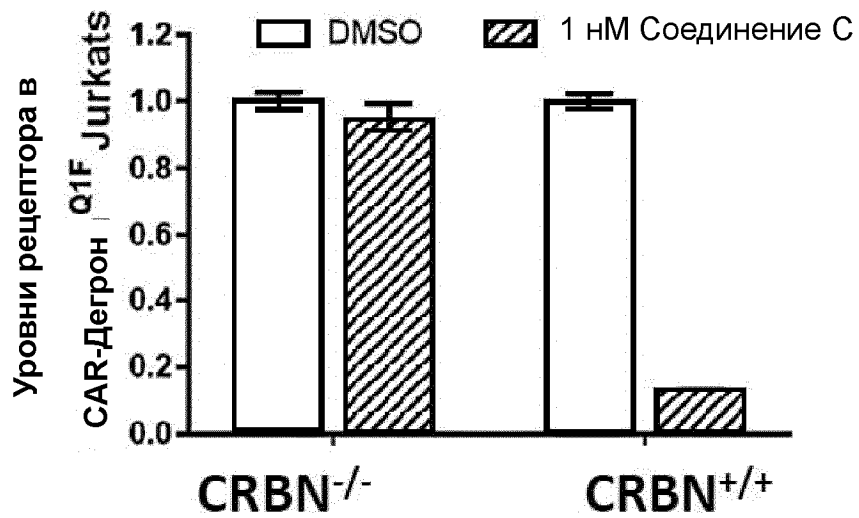
Фиг. 10А



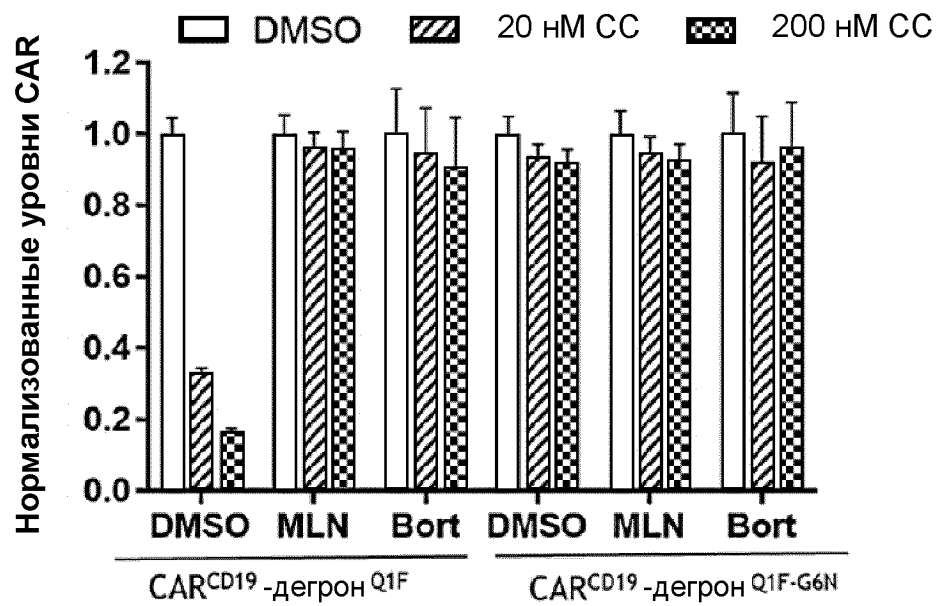
Фиг. 10В



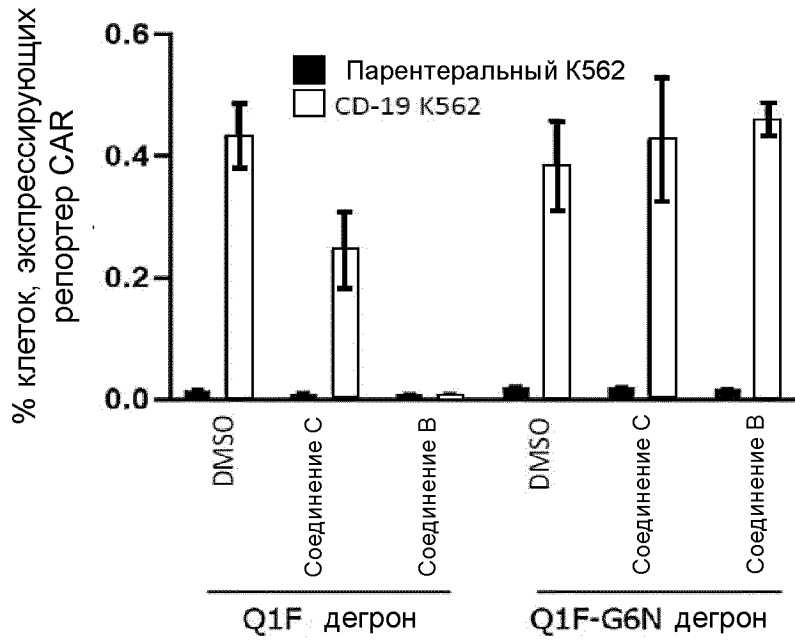
Фиг. 11А



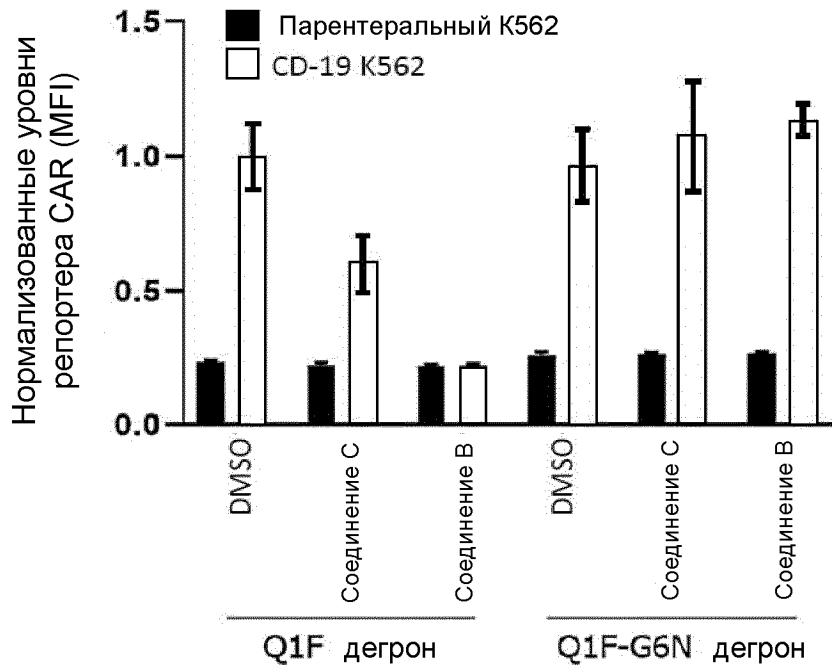
Фиг. 11В



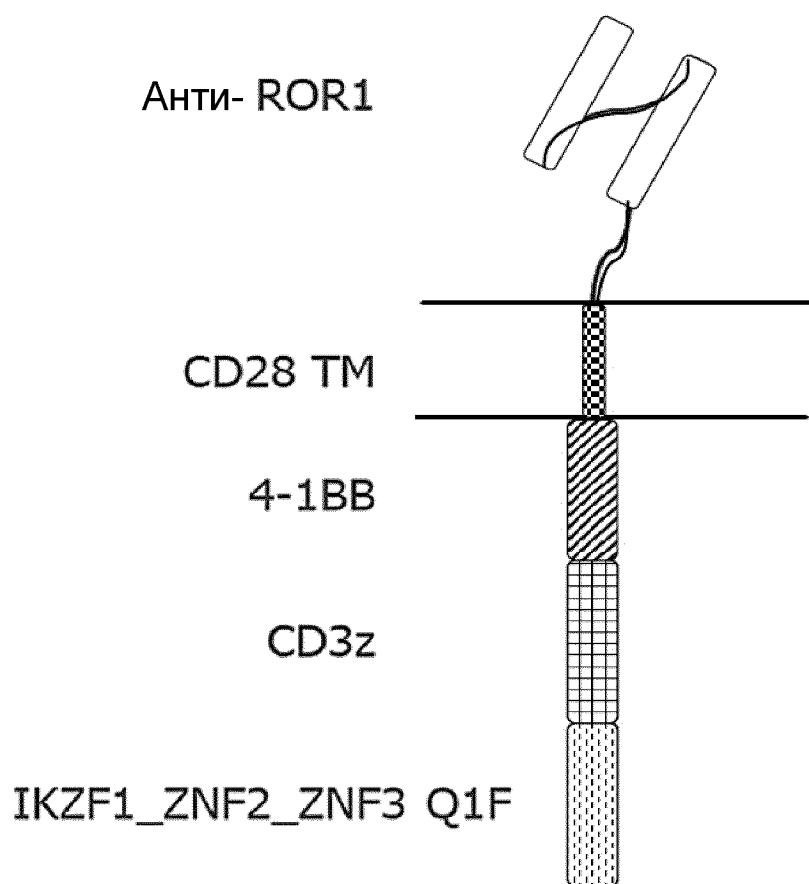
Фиг. 11С



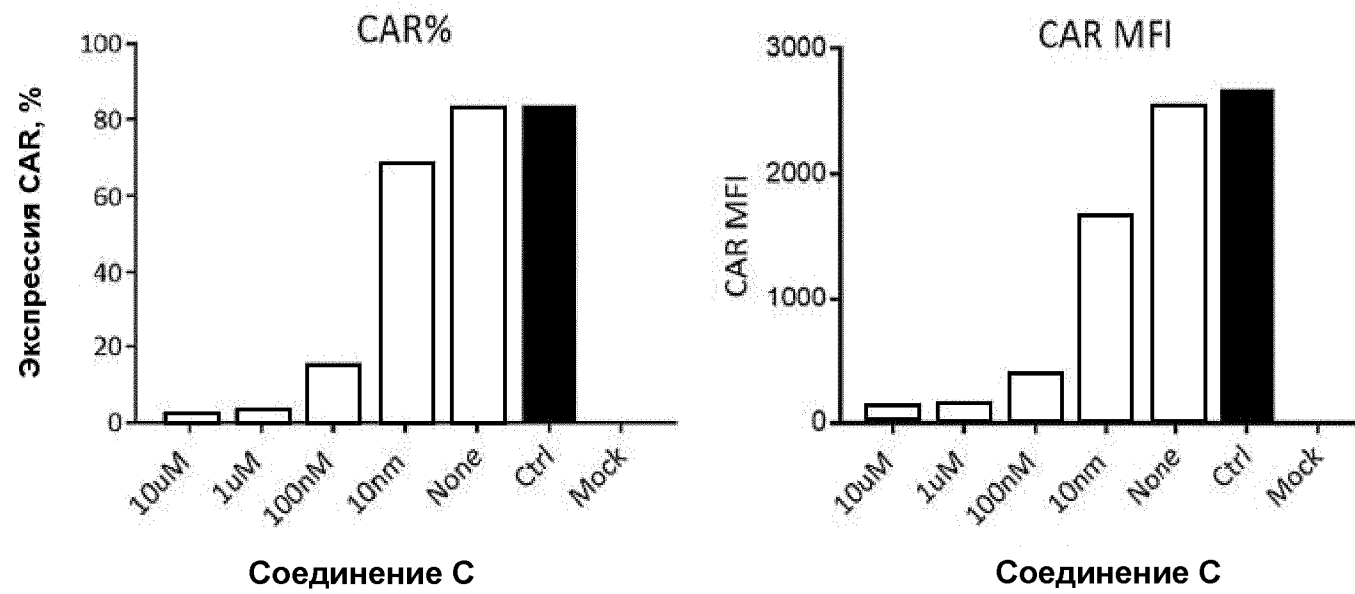
Фиг. 12А



Фиг. 12В

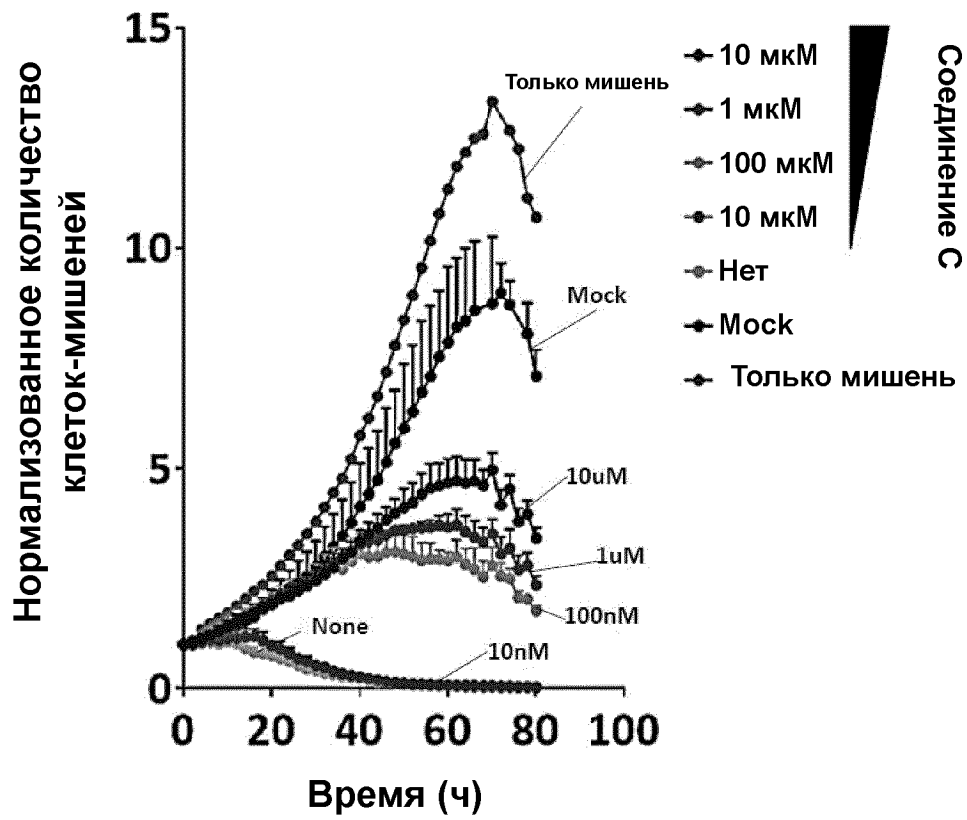


Фиг. 13А



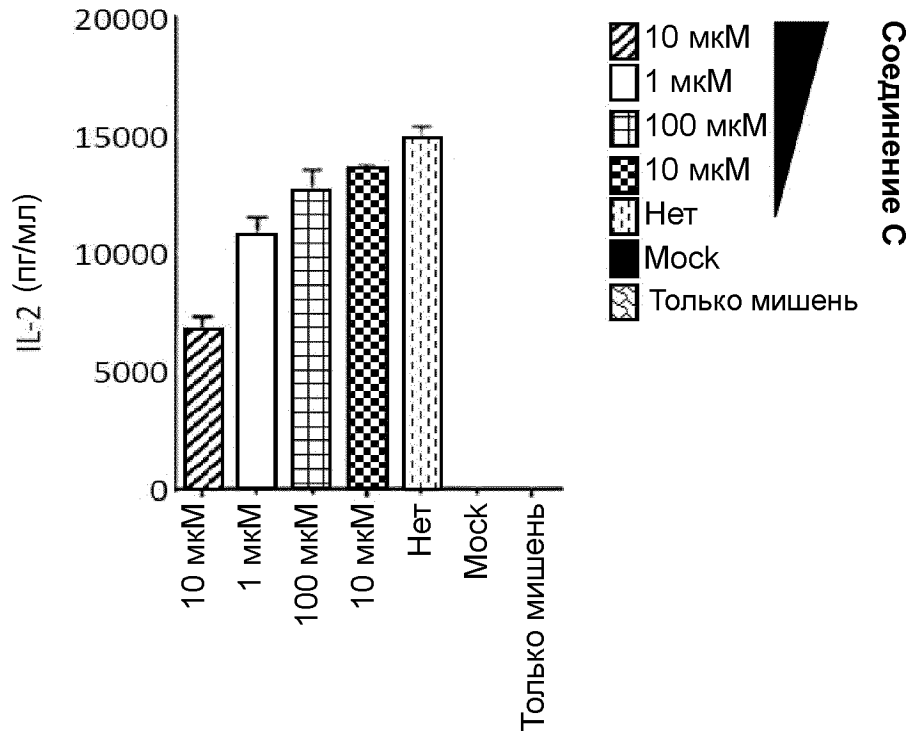
Фиг. 13В

Анализ киллинга клеток-мишеней



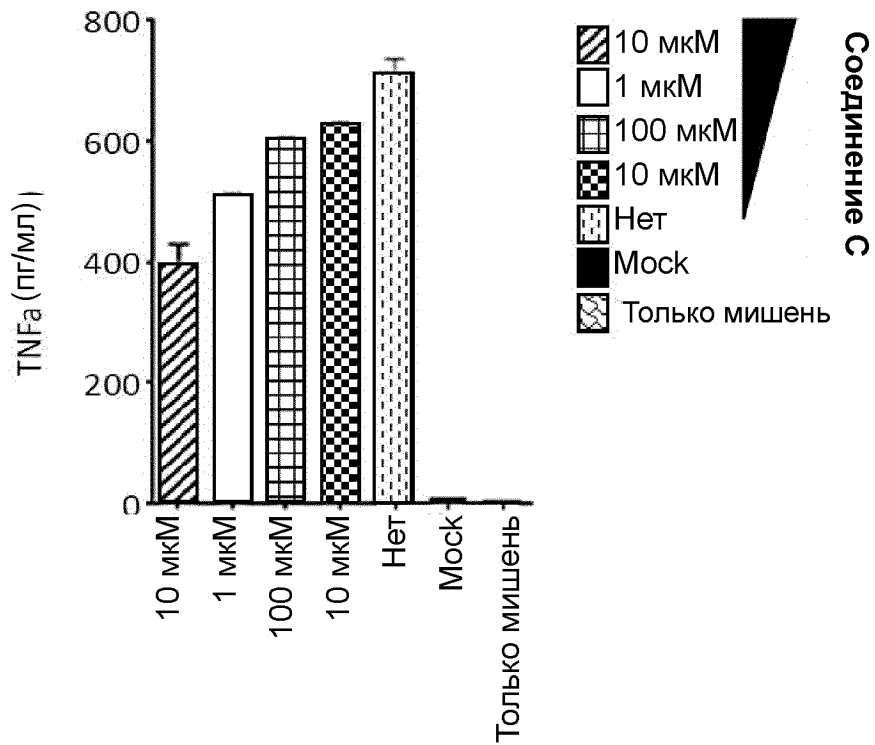
Фиг. 14А

Продуцирование IL-2

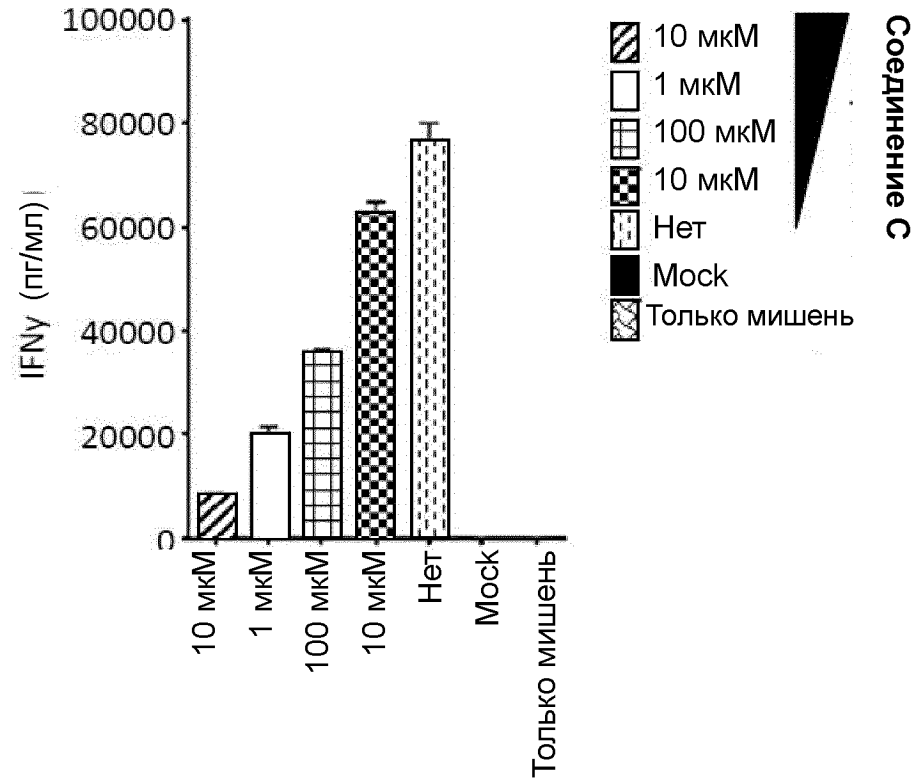


Фиг. 14В

Продуцирование TNFα

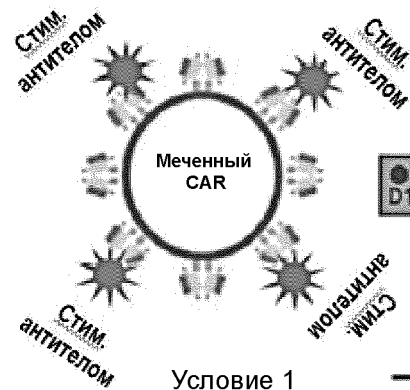


Фиг. 14С

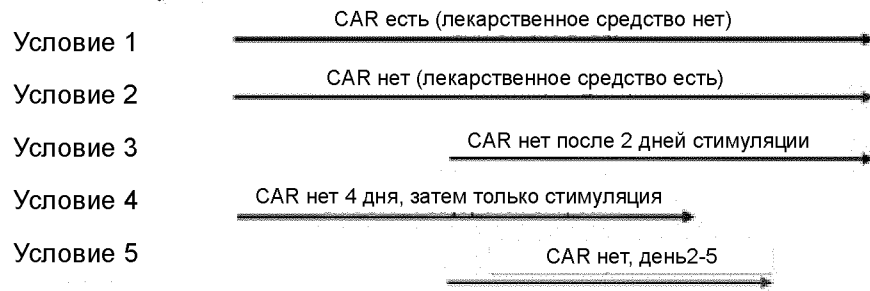
Продукция IFN γ 

Фиг. 14D

День 0: начало активации меченных CAR T антителами против CAR

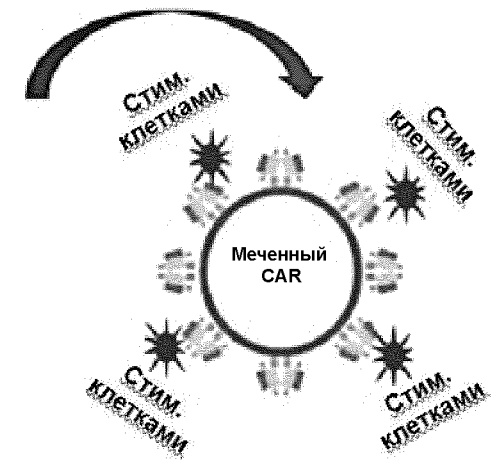


7 дней хронической стимуляции

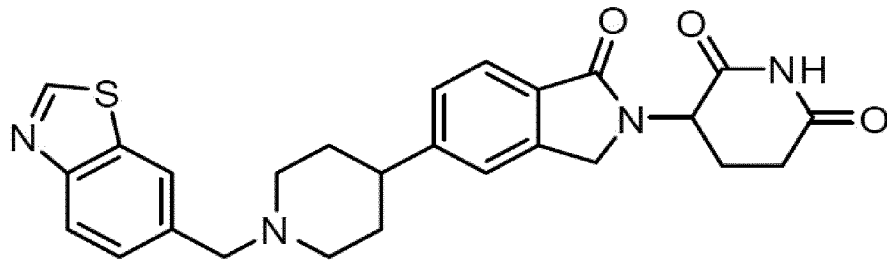


Отмывка лекарственного средства и отдых в среде в течение 24 часов

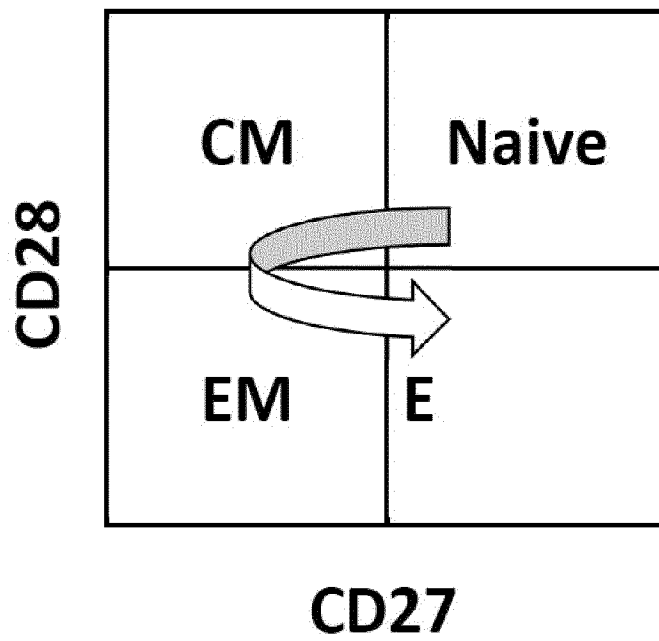
День 7: повторная стимуляция клеточной линией рака



Фиг. 15

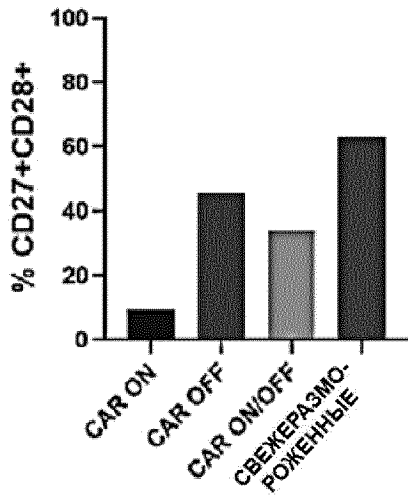


Фиг. 16А

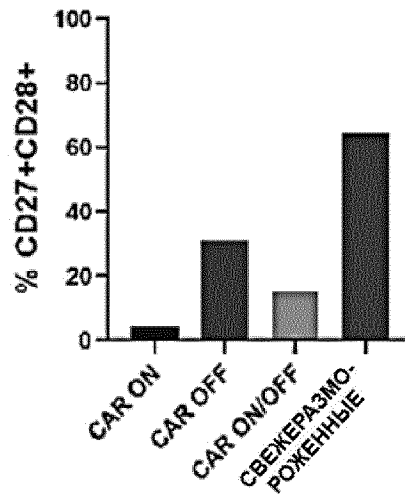


Фиг. 16В

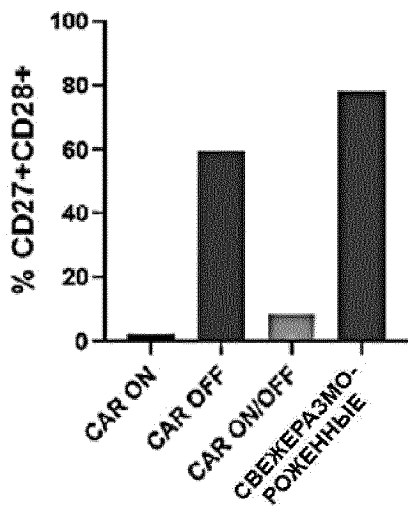
% Naive (CD27+CD28+) CD4 Донор 1



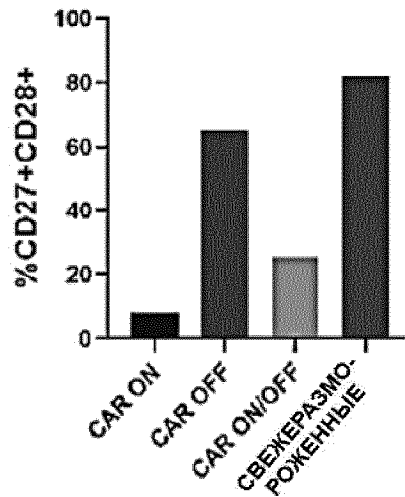
% Naive (CD27+CD28+) CD8 Донор 1



% Naive (CD27+CD28+) CD4 Донор 2

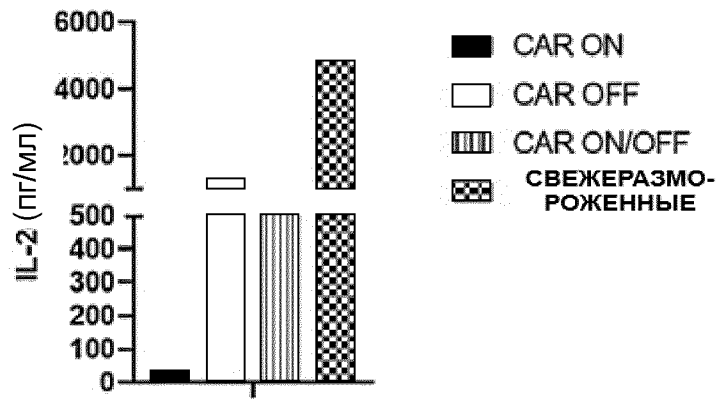


% Naive (CD27+CD28+) CD8 Донор 2

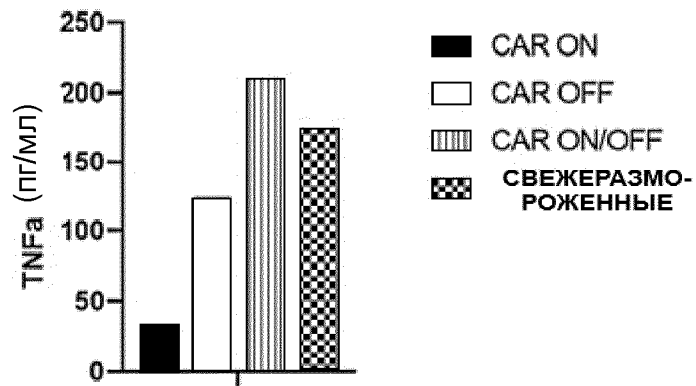


Фиг. 16С

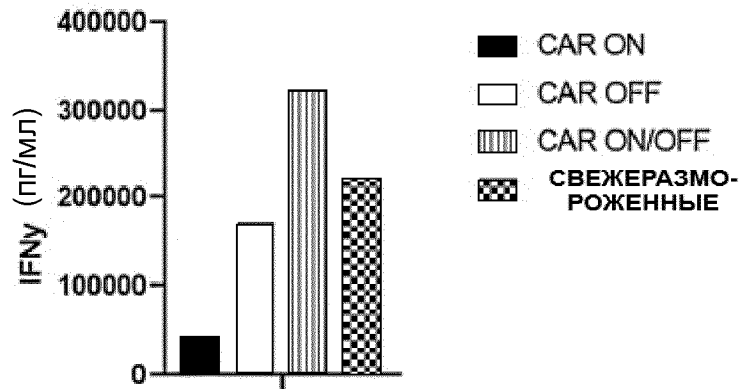
Концентрация IL-2



Концентрация TNFα

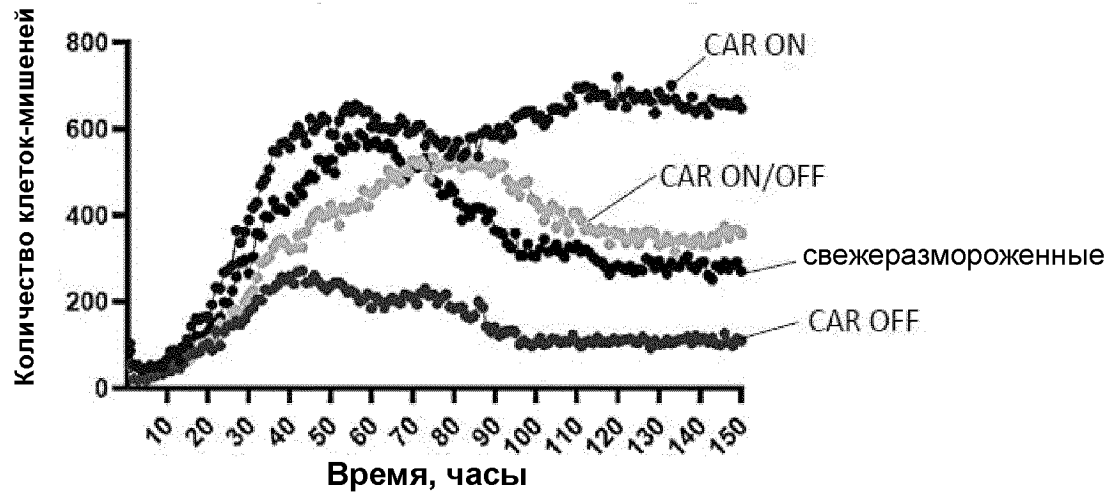


Концентрация IFNγ

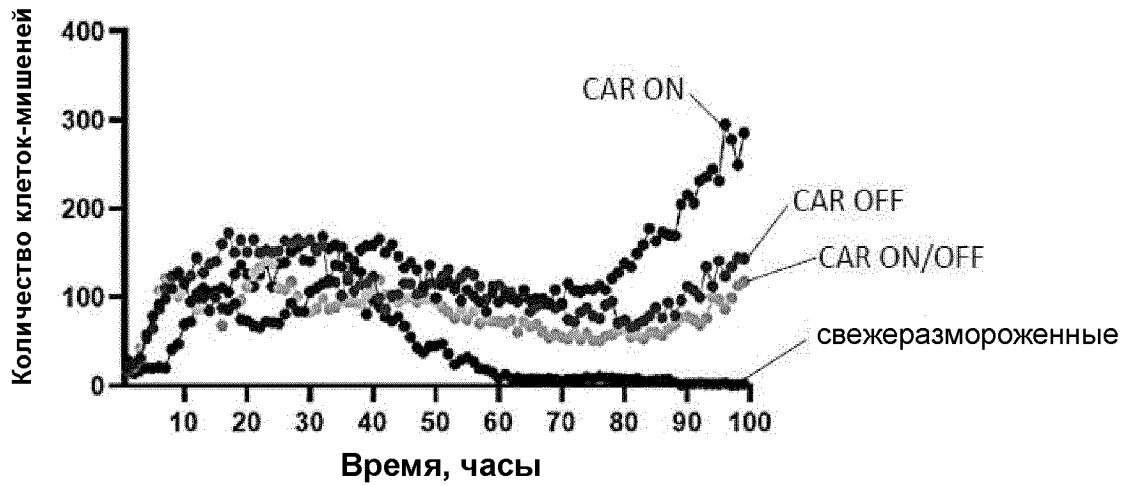


Фиг. 17А

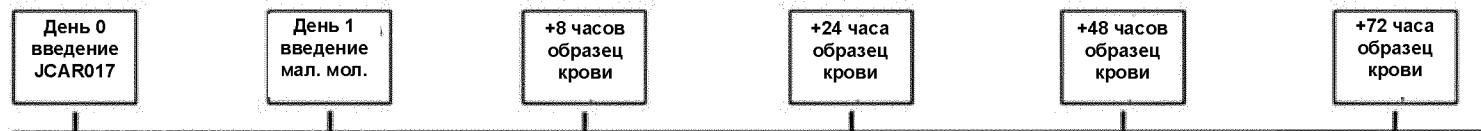
Донор 1 уничтожение сфероидных
опухолевых клеток



Донор 2 уничтожение сфероидных
опухолевых клеток



Фиг. 17В

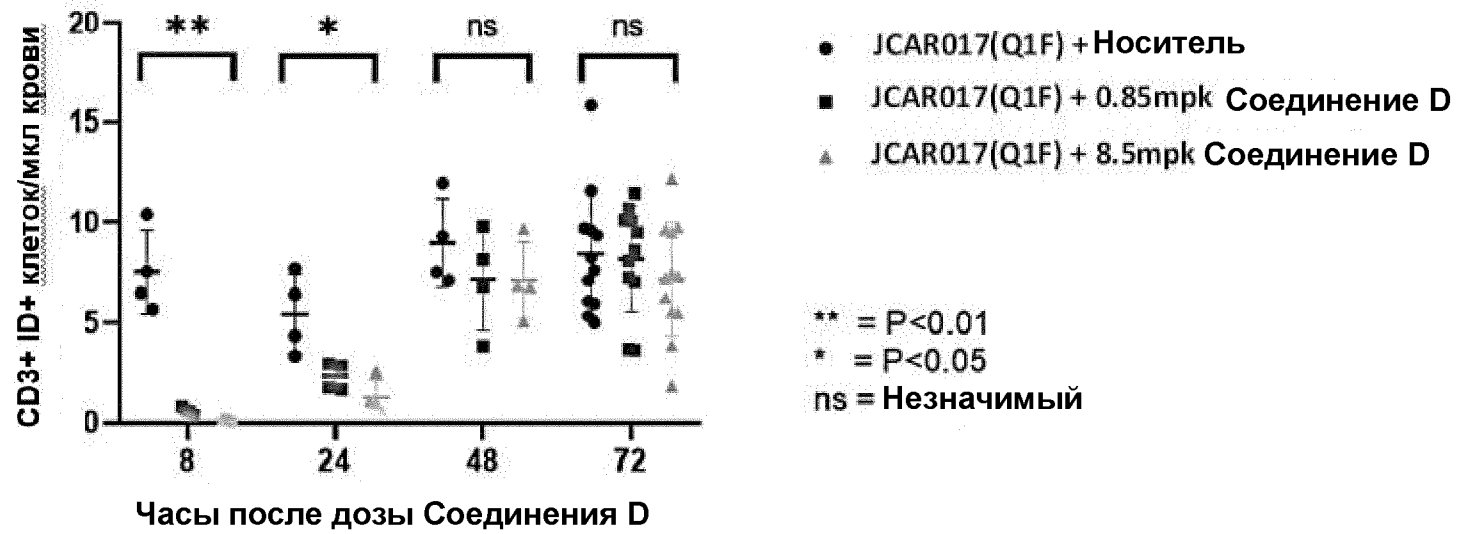


Фиг. 18А

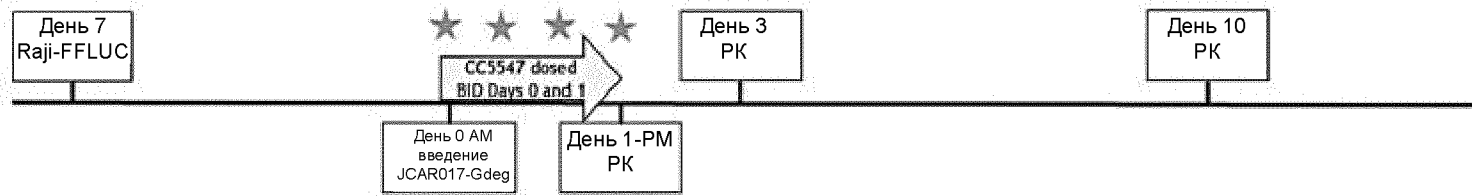
Группа	N	JCAR017-Gdeg#	Доза мал. мол.(мрк)	Доза (мг/мышь)	Мг/группу (x1.5)
JCAR017Gdeg + VEN	12	2E6	0	0	0
JCAR017Gdeg + Соединение D	12	2E6	0.85	0.017	0.306
JCAR017Gdeg + Соединение D	12	2E6	8.5	0.17	3.06

Фиг. 18В

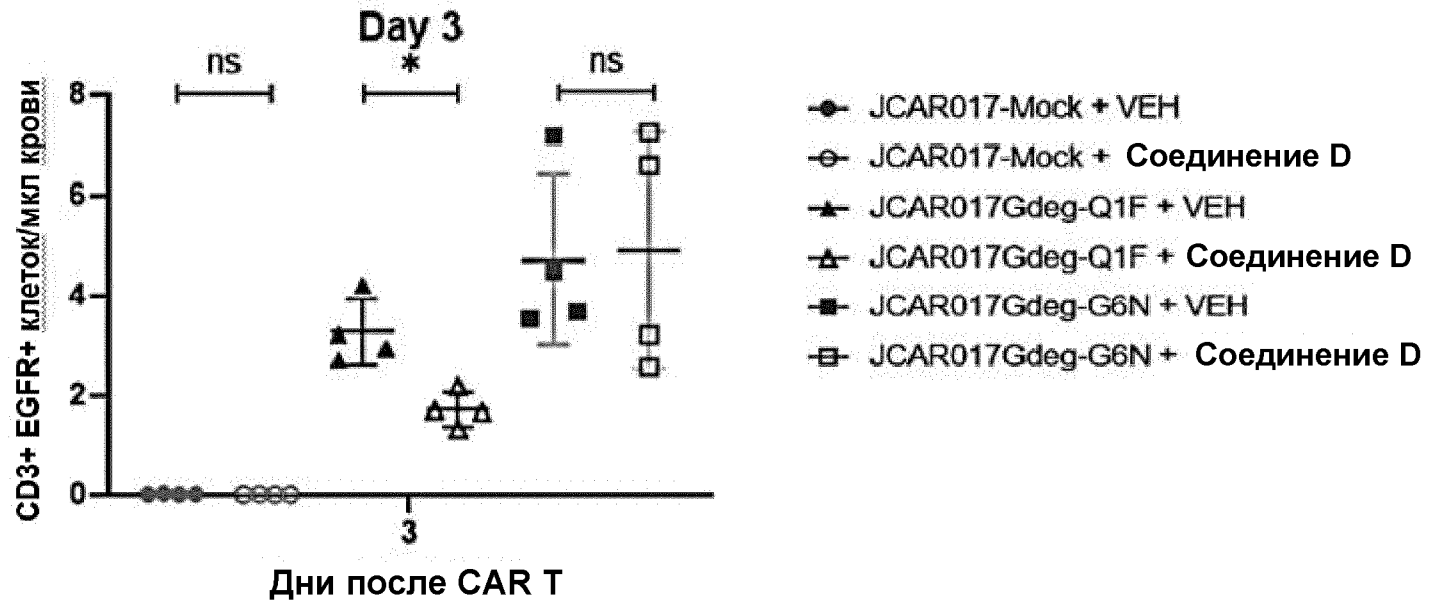
Количества CD3+ ID+



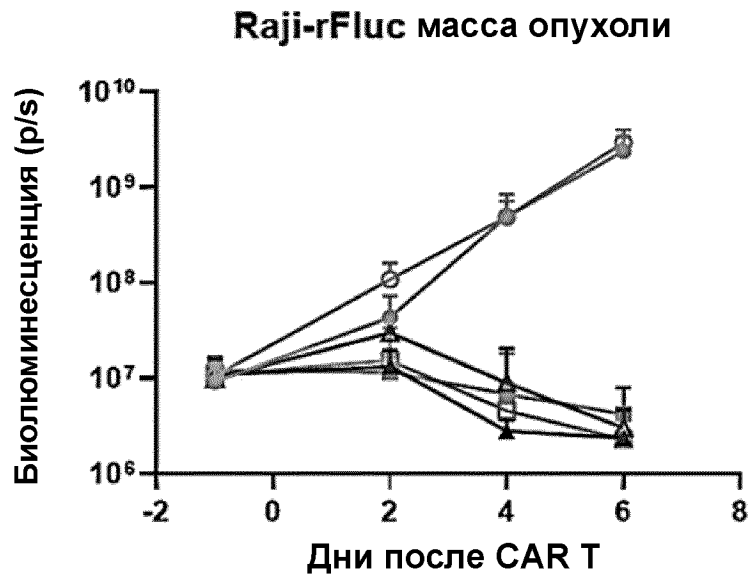
Фиг. 18С



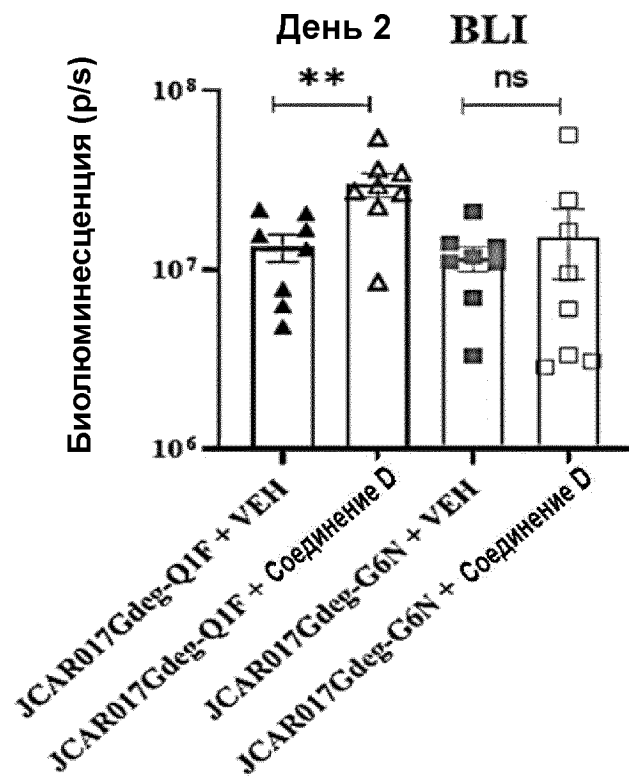
Фиг. 19А



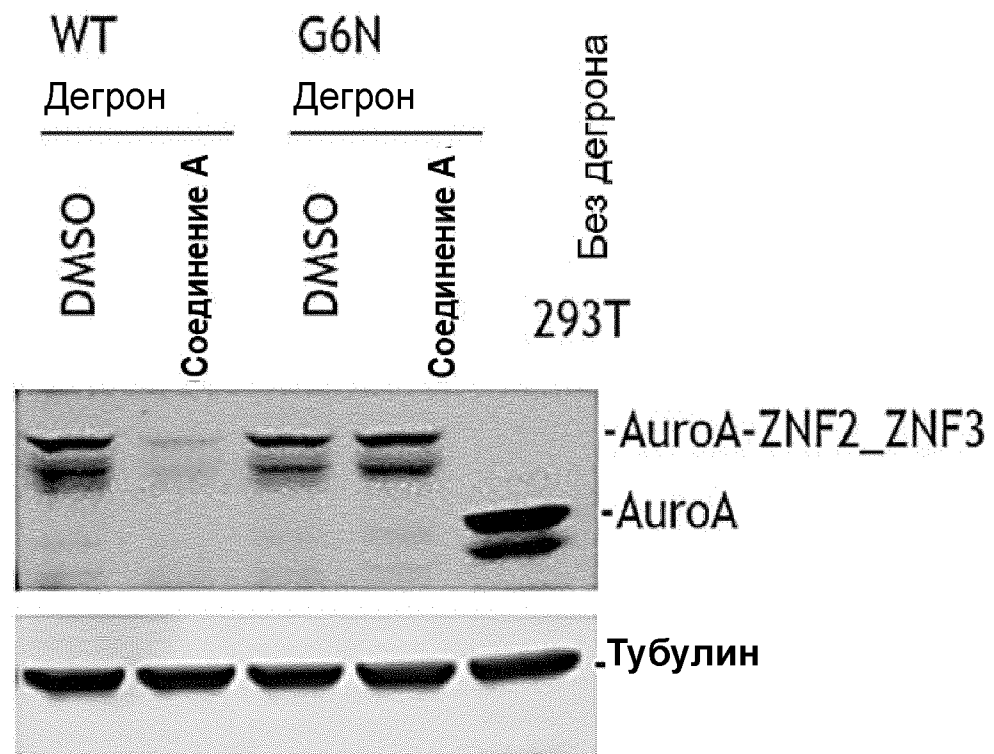
Фиг. 19В



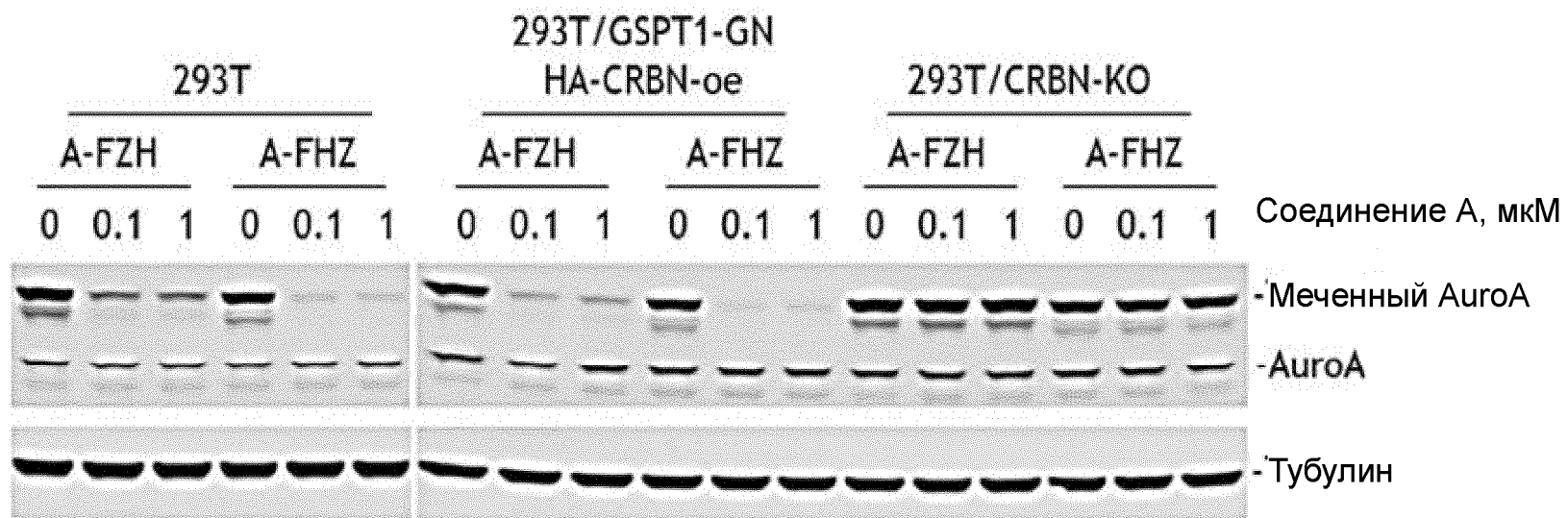
Фиг. 19С



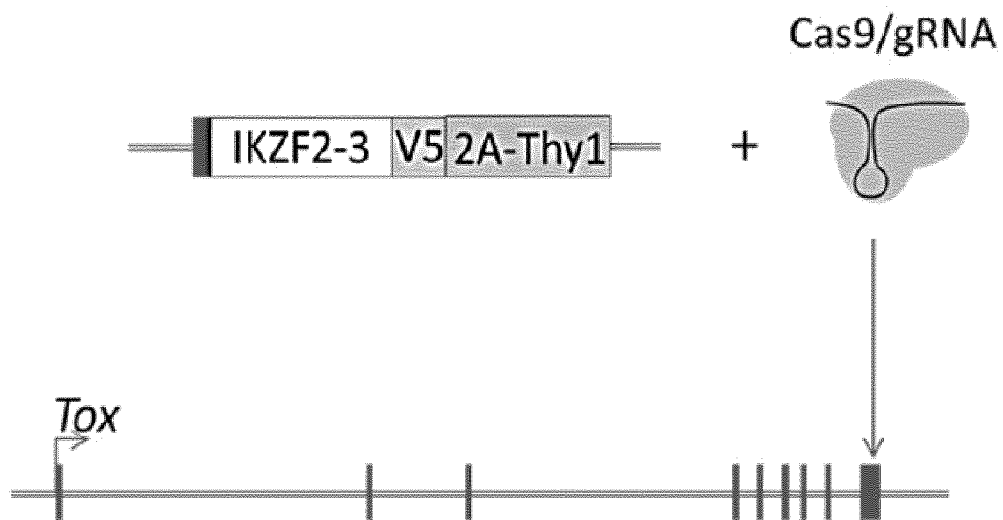
Фиг. 19D



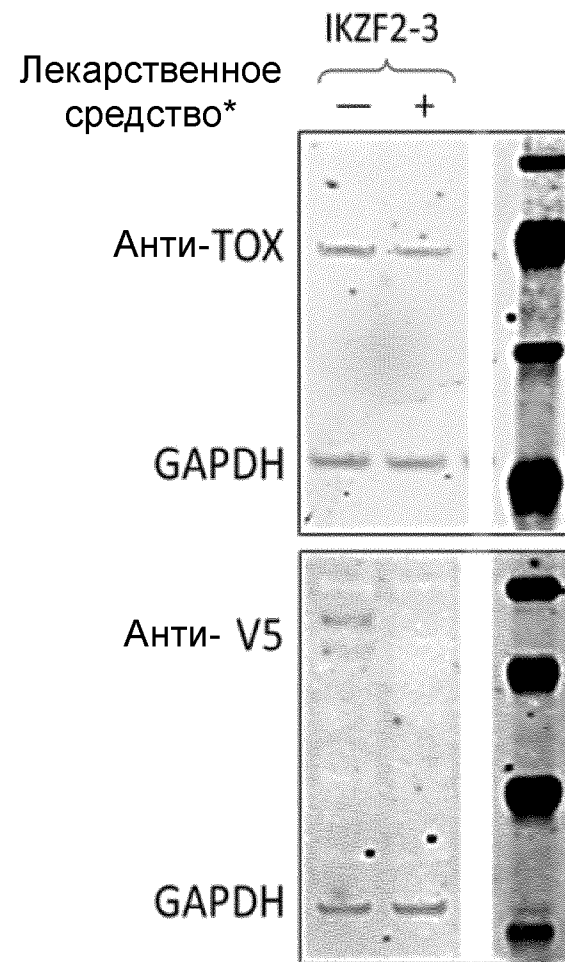
Фиг. 20А



Фиг. 20В



Фиг. 20С



Фиг. 20D