

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202491261 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.07.12

(22) Дата подачи заявки
2022.11.14

(51) Int. Cl. C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) СОДЕРЖАЩИЕ D-ДОМЕН ПОЛИПЕПТИДЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 63/279,489

(32) 2021.11.15

(33) US

(86) PCT/US2022/079796

(87) WO 2023/086983 2023.05.19

(71) Заявитель:
ЭРСЕЛЛКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Лафлер Дэвид, Суэрс Джеффри С.,
Эдвардс Джастин (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к D-доменсодержащим полипептидам, которые специфично связывают представляющие интерес мишени, а также к нуклеиновым кислотам, кодирующим D-доменсодержащие полипептиды, векторам, содержащим нуклеиновые кислоты, и клеткам-хозяевам, содержащим нуклеиновые кислоты и векторы. Изобретение также относится к способам получения и применения D-доменсодержащих полипептидов, нуклеиновых кислот, векторов и клеток-хозяев, например, без ограничения этим, в диагностических и терапевтических целях. Изобретение также относится к композициям на основе многофункциональных химерных антигенных рецепторов (CAR) и адаптеров, а также к их применению в способах направления иммунных ответов против клеток-мишеней. В некоторых вариантах осуществления способы включают применение клетки, экспрессирующей CAR, в комбинации с адаптером. Адаптер придает способность модулировать, изменять и/или направлять иммунный ответ, опосредуемый CAR-экспрессирующей клеткой, *in vitro* и *in vivo*.

A1

202491261

202491261

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-581204EA/55

СОДЕРЖАЩИЕ D-ДОМЕН ПОЛИПЕПТИДЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По этой заявке испрашивается приоритет заявки на патент США 63/279,489, поданной 15 ноября 2021 года, которая полностью включена в настоящее описание путем ссылки.

ССЫЛКА НА СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[0002] Содержание представленного в электронном виде списка последовательностей (Имя: 6666_0301_Sequence_Listing.xml; Размер: 163,868 байтов; и Дата Создания: 6 ноября 2022 года), поданного с заявкой, включено полностью включено в настоящее описание путем ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0003] Область изобретения в целом относится к содержащим D-домен полипептидам, включающим многофункциональные химерные антигенные рецепторы, и к Адаптерам, включающим D-домены, а также к их применению в способах лечения, например, путем направления иммунных ответов на клетки-мишени.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Адоптивный перенос генетически модифицированных Т-клеток представляет собой быстро развивающийся инновационный способ лечения рака. Т-клетки, несущие рекомбинантные химерные антигенные рецепторы (CAR), представляют собой обновляемые лекарственные средства с возможностью обеспечения длительного функционального иммунитета. Клиническая эффективность с CD19 CAR-T-клетками была продемонстрирована при различных гематологических онкологических заболеваниях, при этом также многообещающие данные ранних фаз клинических исследований были представлены для других генетически модифицированных CAR-T при солидных опухолях. Впрочем, прежде чем CAR технология сможет в более полной мере реализовать свой существенный потенциал, предстоит преодолеть серьезные сложности.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В одном аспекте изобретение относится к белкам, включающим содержащий D-домен (DD) мишень-связывающий домен (DDpp), где DD специфично связывает представляющую интерес мишень. В некоторых вариантах осуществления представляющая интерес мишень представляет собой CD123 человека (SEQ ID NO: 1) или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления DDpp являются моновалентными или мультивалентными. В некоторых вариантах осуществления DDpp являются моноспецифичными или мультиспецифичными. В других вариантах осуществления DDpp являются моноспецифичными и мультивалентными. В других вариантах осуществления DDpp являются мультиспецифичными и мультивалентными. Изобретение также относится к слитым белкам, включающим один или более DD, а также к способам получения и

применения слитых белков. Изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим DDpp, и векторам и клеткам-хозяевам, содержащим такие нуклеиновые кислоты. Неограничивающие примеры таких применений включают, без ограничения, анализ мишеней, а также диагностические и терапевтические применения. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает CD123-связывающий DD, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает DD, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает DD, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

[0006] В одном аспекте изобретение относится к химерному антигенному рецептору (CAR), который включает мишень-связывающий домен, включающий раскрытый DD. В некоторых вариантах осуществления DD связывает CD123 и включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления CD123-специфичный DD включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления CD123-специфичный DD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления DD связывает р26 АФП (SEQ ID NO: 37) и включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В некоторых вариантах осуществления CAR включает мишень-связывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно включает второй мишень-связывающий домен, имеющий такую же или иную мишень, нежели мишень-связывающий домен DD. В некоторых вариантах осуществления CAR экспрессируется в иммунной клетке. В некоторых вариантах осуществления CAR экспрессируется в иммунной эффекторной клетке. В некоторых вариантах осуществления иммунной клетка является Т-клеткой (CAR-Т-клеткой) или естественной киллерной (NK) клеткой (CAR-NK-клеткой). В некоторых вариантах осуществления клетка является аутологичной иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является аутологичной Т-клеткой (CAR-Т-клеткой) или аутологичной естественной киллерной (NK) клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является аллогенной иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является аллогенной Т-клеткой (CAR-Т-клеткой) или аллогенной естественной киллерной (NK) клеткой. В некоторых вариантах осуществления CAR экспрессируется в иммунной клетке, полученной из человеческих эмбриональных стволовых клеток (CAR-hESC) или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (CAR-iPSC клетка).

[0007] Изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим раскрытый DDpp (например, слитый белок DDpp, CAR или Адаптер). Изобретение дополнительно относится к векторам (например, плазмидам, вирусным векторам и

невирусным векторам), содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие DDpp (например, слитый белок DDpp, CAR или Адаптер), и к клеткам-хозяевам, содержащим такие нуклеиновые кислоты и векторы. В некоторых вариантах осуществления вектор включает нуклеотидную последовательность, которая регулирует экспрессию полипептида, кодируемого молекулой нуклеиновой кислоты. В других вариантах осуществления вектор включает последовательность индуцируемого промотора. В дополнительных вариантах осуществления вектор включает один или более дополнительных стандартных компонентов для экспрессии белка, кодируемого нуклеиновой кислотой (например, промоторы, пакующие компоненты и т.д.). В некоторых вариантах осуществления вектор является лентивирусным вектором.

[0008] В одном аспекте изобретение относится к клеткам-хозяевам, включающим молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие мишень-связывающий DDpp, раскрытый в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева (например, клетки клеточной линии) генно-инженерно модифицированы для экспрессии белка, содержащего DD, раскрытый в настоящем изобретении (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8-33). В некоторых вариантах осуществления экспрессия DDpp (например, слитого белка DDpp или Адаптера) клетками-хозяевами обеспечивает получение и выделение DDpp. В некоторых вариантах осуществления экспрессия приводит к экспрессии DDpp (например, CAR) на поверхности мембраны и/или в мембране клеток-хозяев. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин является бактериальной, дрожжевой клеткой, клеткой гриба или растительной клеткой. В других вариантах осуществления клетка-хозяин является клеткой млекопитающего. В другом варианте осуществления клетка млекопитающего является иммунной клеткой. В одном варианте осуществления клетка-хозяин является человеческой иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления человеческая иммунная клетка является Т-клеткой. В других вариантах осуществления человеческая иммунная клетка является естественной киллерной (NK) клеткой. В некоторых вариантах осуществления человеческая иммунная клетка экспонирует DDpp (например, CAR) на своей клеточной поверхности.

[0009] В одном аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, экспрессирующей белок, включающий DD, раскрытый в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин экспрессирует химерный антигенный рецептор (CAR), включающий DD, раскрытый в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления CAR включает мишень-связывающий домен, который включает DD, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 8-33, и трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления CD123-специфичный DD включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления CD123-специфичный DD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно включает внутриклеточный домен (включающий

сигнальный домен). В некоторых вариантах осуществления иммунная CAR-клетка является Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления CAR иммунная эффекторная клетка является NK-клеткой. В некоторых вариантах осуществления CAR иммунная эффекторная клетка не является Т-клеткой или NK-клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная CAR-клетка является аутологичной иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная CAR-клетка является аллогенной иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин является иммунной эффекторной клеткой, которая дополнительно включает второй CAR полипептид, имеющий DD или другой связывающий домен (например, scFv), который специфично связывает такую же или другую мишень (например, другой эпитоп той же мишени или вторую мишень, представляющую интерес), экспрессируемую раковой клеткой, как и первый CAR, экспрессируемый иммунной клеткой-хозяином.

[0010] Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим белок, включающий DD, раскрытый в настоящем изобретении, нуклеиновые кислоты, раскрытые в настоящем изобретении, кодирующие белки, векторы, раскрытые в настоящем изобретении, содержащие нуклеиновые кислоты, вирусы, кодирующие белки, и клетки-хозяева, раскрытые в настоящем изобретении, содержащие нуклеиновые кислоты и/или векторы. Кроме того, изобретение относится к наборам, содержащим один или более раскрытых мишень-связывающих DDpp (например, слитых белков DDpp, таких как DD-Fc и DD-CAR, или Адаптер), молекулы нуклеиновой кислоты, векторы и клетки-хозяева (например, терапевтический набор, диагностический набор, набор для применения в исследовании и т.д.).

[0011] DDpp, раскрытый в настоящем изобретении, обладает активностями, которые включают, без ограничения, способность специфично связывать представляющую интерес мишень (например, CD123) *in vitro* или *in vivo* и возможность использования в качестве реакционноспособного участка для соединения или связывания белка, такого как слитый белок DDpp, с одной или более дополнительными структурами (например, твердой подложкой), и/или для других модификаций. DDpp, раскрытый в настоящем изобретении, также может обладать дополнительными предпочтительными свойствами и/или функциональностями, полезными при производстве, изготовлении лекарственных форм и в биологических, диагностических, и терапевтических применениях.

[0012] Изобретение также относится к способам применения DDpp в диагностических и терапевтических целях. В одном варианте осуществления изобретение относится к способу лечения заболевания или нарушения, включающему введение терапевтически эффективного количества DDpp (например, слитого белка DDpp, CAR и/или Адаптера), который специфично связывает представляющую интерес терапевтическую мишень (например, CD123), нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления заболеванием или нарушением является рак, В-клеточная неоплазия, заболевание или нарушение иммунной системы или инфекция. Изобретение также относится к способам лечения заболевания или нарушения, которые

включают совместное введение с дополнительным терапевтическим средством в сочетании с раскрытым DDrp. В некоторых вариантах осуществления заболеванием или нарушением является острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), миелодиспластический синдром (например, миелодиспластический синдром высокого риска), В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, лимфома Ходжкина или бластная плазмоцитоидная дендритно-клеточная неоплазия (БПДКН). В некоторых вариантах осуществления заболеванием или нарушением является острый миелоидный лейкоз.

[0013] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к:

[1.] Белку, включающему содержащий D-домен мишень-связывающий домен, который специфично связывает CD123 и включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8-32 или 33.

[2.] Белку [1], где D-домен включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, 13, 14, или 31-33.

[3.] Белку [1], где D-домен включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

[4.] Белку согласно любому из [1]-[3], где D-домен слит с гетерологичным полипептидом.

[5.] Белку [4], где гетерологичный полипептид включает полноразмерное антитело или фрагмент антитела.

[6.] Белку [4], где D-домен слит с N-концом тяжелой цепи полноразмерного антитела; N-концом легкой цепи полноразмерного антитела; C-концом тяжелой цепи полноразмерного антитела; или C-концом легкой цепи полноразмерного антитела.

[7.] Белку [4], где гетерологичный полипептид представляет собой Fc-домен.

[8.] Белку [4], где гетерологичный полипептид включает компонент, выбранный из группы, состоящей из следующего:

- (a) трансмембранный домен;
- (b) мембраноассоциированный домен;
- (c) человеческий сывороточный альбумин или его фрагмент;
- (d) АФП или его фрагмент;
- (e) p26 АФП или его фрагмент; и
- (f) внеклеточный домен рецептора или его фрагмент.

[9.] Белку [4], где гетерологичный полипептид включает внеклеточный домен, или фрагмент внеклеточного домена, рецептора, выбранного из группы, состоящей из: ВСМА, CD123, CS1 и CD19.

[10.] Белку согласно любому из [2]-[9], дополнительно включающий пептидный линкер.

[11.] Белку согласно любому из [1]-[10], который является меченым.

[12.] Белку [11], где метка выбрана из группы, состоящей из ферментной метки, флуоресцентной метки, люминесцентной метки, биолюминесцентной метки и молекулы биотина.

[13.] Белку согласно любому из [1]-[12], который конъюгирован с терапевтическим или цитотоксическим средством.

[14.] Химерному антигенному рецептору (CAR), который включает мишень-связывающий домен, включающий белок согласно любому из [1]-[3].

[15.] CAR согласно [14], который включает мишень-связывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен.

[16.] CAR согласно [14] или [15], где трансмембранный домен включает трансмембранный домен CD8a, 41BB или CD28.

[17.] CAR согласно любому из [14]-[16], где внутриклеточный сигнальный домен выбран из группы, состоящей из домена альфа, бета или дзета-цепи Т-клеточного рецептора человека; домена 41BB человека; домена CD28 человека; и их любой комбинации.

[18.] CAR согласно любому из [14]-[17], где внутриклеточный сигнальный домен включает внутриклеточный домен костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, 41BB, OX40, CD30, CD40, PD1, лимфоцитарного функционально-ассоциированного антигена 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, NKG2D, B7-H3, лиганда, который специфично связывается с CD83, и их любой комбинации.

[19.] CAR согласно любому из [14]-[18], дополнительно включающему пептидный линкер.

[20.] CAR согласно [14], включающему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62-66 или 67.

[21.] CAR согласно [14], включающему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67.

[22.] Белку согласно любому из [1]-[13] или CAR согласно любому из [14]-[21], который дополнительно включает второй мишень-связывающий домен, имеющий такую же мишень, как и содержащий D-домен мишень-связывающий домен, или другую мишень.

[23.] Адаптеру, включающему: (а) содержащий D-домен мишень-связывающий домен, который специфично связывает CD123 и включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8-32 или 33, и (б) антигенную детерминанту (AD).

[24.] Адаптеру согласно [23], где D-домен включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, 13, 14 или 31-33.

[25.] Адаптеру согласно [23], где D-домен включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

[26.] Адаптеру согласно любому из [23]-[25], где AD включает p26 АФП или его фрагмент.

[27.] Адаптеру согласно [26], где p26 АФП включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-43 и 44.

[28.] Адаптеру согласно [26], где p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37.

[29.] Адаптеру согласно [26], где p26 АФП включает аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 39.

[30.] Адаптеру согласно любому из [23]-[25], где AD включает ВСМА (SEQ ID NO: 34) или его фрагмент.

[31.] Адаптеру согласно любому из [23]-[30], дополнительно включающему пептидный линкер.

[32.] Адаптеру согласно любому из [23]-[31], где Адаптер включает один D-домен, который специфично связывает CD123.

[33.] Адаптеру согласно [32], который включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50-54 или 55.

[34.] Адаптеру согласно [32], который включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50.

[35.] Адаптеру согласно любому из [23]-[31], где Адаптер включает два D-домена, которые специфично связывают CD123.

[36.] Адаптеру согласно [35], который включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56-60 или 61.

[37.] Адаптеру согласно [35], который включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61.

[38.] Выделенному полинуклеотиду, кодирующему белок согласно любому из [1]-[10] или [22], или Адаптер согласно любому из [23]-[37].

[39.] Вектору, включающему полинуклеотид согласно [38].

[40.] Вектору [39], где полинуклеотид функционально связан с нуклеотидной последовательностью, которая регулирует экспрессию белка, кодируемого полинуклеотидом.

[41.] Клетке-хозяину, включающей полинуклеотид согласно [38] или вектор согласно [39] или [40].

[42.] Способу получения белка согласно любому из [1] о 10 или 22 или Адаптера согласно любому из [23]-[37], включающему культивирование клетки-хозяина [41] в подходящих условиях для получения белка или Адаптера.

[43.] Выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR согласно любому из [14]-[22].

[44.] Вектору, включающему полинуклеотид согласно [43].

[45.] Вектору [44], где полинуклеотид функционально связан с нуклеотидной последовательностью, которая регулирует экспрессию белка, кодируемого полинуклеотидом.

[46.] Вектору согласно [45], который является лентивирусным вектором.

[47.] Клетке-хозяину, включающей полинуклеотид согласно [43] или вектор согласно любому из [44]-[46].

[48.] Клетке, генно-инженерно модифицированной для экспрессии CAR согласно любому из [14]-[22].

[49.] Клетке [47] или [48], где клетка представляет собой Т-клетку или естественную

киллерную (NK) клетку.

[50.] Фармацевтической композиции, включающей белок согласно любому из [1]-[13] или [22] и фармацевтически приемлемый эксципиент.

[51.] Фармацевтической композиции, включающей вектор согласно [44] и фармацевтически приемлемый эксципиент.

[52.] Фармацевтической композиции согласно [51], где вектор является лентивирусным вектором.

[53.] Фармацевтической композиции, включающей клетку, экспрессирующую CAR согласно любому из [14]-[22], и фармацевтически приемлемый эксципиент.

[54.] Фармацевтической композиции [53], где клетка представляет собой Т-клетку или естественную киллерную (NK) клетку.

[55.] Набору, включающему Адаптер согласно любому из [23]-[37].

[56.] Набору, включающему вектор согласно [44].

[57.] Набору, включающему клетку, экспрессирующую CAR согласно любому из [14]-[22].

[58.] Набору согласно [57], где клетка представляет собой Т-клетку или естественную киллерную (NK) клетку.

[59.] Способу доставки иммунного ответа к одной или более клеток-мишеней, включающий контакт композиции, включающей клетку-мишень, с клеткой, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен.

[60.] Способу уничтожения клетки-мишени, включающему контакт композиции, включающей клетку-мишень, с клеткой, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен.

[61.] Способу согласно [59] или [60], где клетка-мишень экспрессирует CD123.

[62.] Способу согласно любому из [59]-[61], где D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-32 и 338-33, 99 и 100.

[63.] Способу согласно любому из [59]-[61], где D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33.

[64.] Способу согласно любому из [59]-[61], где D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

[65.] Способу согласно любому из [59]-[64], где трансмембранный домен включает трансмембранный домен CD8a, 41BB или CD28.

[66.] Способу согласно любому из [59]-[65], где внутриклеточный сигнальный домен выбран из группы, состоящей из домена альфа, бета или дзета-цепи Т-клеточного рецептора человека; домена 41BB человека; домена CD28 человека; и их любой комбинации.

[67.] Способу согласно любому из [59]-[66], где внутриклеточный сигнальный домен

включает внутриклеточный домен костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, 41BB, OX40, CD30, CD40, PD1, лимфоцитарного функционально-ассоциированного антигена 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, NKG2D, B7-H3, лиганда, который специфично связывается с CD83, и их любой комбинации.

[68.] Способу согласно любому из [59]-[61], где CAR, включающий D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62-66 или 67.

[69.] Способу согласно любому из [59]-[61], где CAR, включающий D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67.

[70.] Способу согласно любому из [59]-[61], где клетка, экспрессирующая CAR, является иммунной клеткой.

[71.] Способу согласно [70], где клетка, экспрессирующая CAR, является иммунной эффекторной клеткой.

[72.] Способу согласно [70], где клетка, экспрессирующая CAR, является Т-клеткой.

[73.] Способу согласно [70], где клетка, экспрессирующая CAR, является естественной киллерной (NK) клеткой.

[74.] Способу согласно любому из [58]-[73], где клетка-мишень является раковой клеткой.

[75.] Способу согласно [74], где клетка-мишень является клеткой острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), клеткой миелодисплазии, клеткой В-клеточного острого лимфобластного лейкоза, клеткой волосатоклеточного лейкоза, клеткой лимфомы Ходжкина или клеткой бластной плазмоцитоидной дендритно-клеточной неоплазии (БПДКН), предпочтительно клеткой острого миелоидного лейкоза (ОМЛ).

[76.] Способу согласно любому из [58]-[73], где контакт происходит в организме пациента-человека.

[77.] Способу доставки иммунного ответа к клетке-мишени, включающему: контакт композиции, включающей клетку-мишень, с Адаптером, где: (а) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает клетку, экспрессирующую CAR, где CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) Адаптер включает: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD p26 АФП.

[78.] Способу доставки иммунного ответа к клетке-мишени, включающему: контакт композиции, включающей клетку-мишень, с Адаптером, где: (а) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает клетку, экспрессирующую CAR, где CAR включает: (i) антигенную детерминанту (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) Адаптер включает: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который

связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП.

[79.] Способу доставки иммунного ответа к клетке-мишени, включающему: контакт композиции, включающей клетку-мишень, с Адаптером, где: (а) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает клетку, экспрессирующую CAR, где CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD), отличной от CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) Адаптер включает: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD, связываемую CAR-рецептором.

[80.] Способу доставки иммунного ответа к клетке-мишени, включающему: контакт композиции, включающей клетку-мишень, с Адаптером, где: (а) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает клетку, экспрессирующую CAR, где CAR включает: (i) антигенную детерминанту (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) Адаптер включает: (i) первый домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с AD-мишенью, и (ii) второй домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП.

[81.] Способу доставки иммунного ответа к клетке-мишени, включающему: контакт композиции, включающей клетку-мишень, с клеткой, экспрессирующей CAR, где: (а) CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD p26 АФП.

[82.] Способу доставки иммунного ответа к клетке-мишени, включающему: контакт композиции, включающей клетку-мишень, с клеткой, экспрессирующей CAR, где: (а) CAR включает: (i) антигенную детерминанту (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП.

[83.] Способу доставки иммунного ответа к клетке-мишени, включающему: контакт композиции, включающей клетку-мишень, с клеткой, экспрессирующей CAR, где: (а) CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD), отличной от CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD, связываемую CAR-рецептором.

[84.] Способу доставки иммунного ответа к клетке-мишени, включающему: контакт композиции, включающей клетку-мишень, с клеткой, экспрессирующей CAR, где: (а) CAR включает: (i) антигенную детерминанту (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii)

внутриклеточный домен; и (b) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает Адаптер, включающий: (i) первый домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с AD-мишенью, и (ii) второй домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП.

[85.] Способу уничтожения клетки-мишени, включающему: контакт композиции, включающей клетку-мишень, с Адаптером, где: (a) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает клетку, экспрессирующую CAR, где CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) Адаптер включает: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD p26 АФП.

[86.] Способу уничтожения клетки-мишени, включающему: контакт композиции, включающей клетку-мишень, с Адаптером, где: (a) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает клетку, экспрессирующую CAR, где CAR включает: (i) антигенную детерминанту (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) Адаптер включает: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП.

[87.] Способу уничтожения клетки-мишени, включающему: контакт композиции, включающей клетку-мишень, с Адаптером, где: (a) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает клетку, экспрессирующую CAR, где CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD), отличной от CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) Адаптер включает: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD, связываемую CAR-рецептором.

[88.] Способу уничтожения клетки-мишени, включающему: контакт композиции, включающей клетку-мишень, с Адаптером, где: (a) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает клетку, экспрессирующую CAR, где CAR включает: (i) антигенную детерминанту (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) Адаптер включает: (i) первый домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с AD-мишенью, и (ii) второй домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП.

[89.] Способу уничтожения клетки-мишени, включающему: контакт композиции, включающей клетку-мишень, с клеткой, экспрессирующей CAR, где: (a) CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD p26

АФП.

[90.] Способу уничтожения клетки-мишени, включающему: контакт композиции, включающей клетку-мишень, с клеткой, экспрессирующей CAR, где: (a) CAR включает: (i) антигенную детерминанту (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП.

[91.] Способу уничтожения клетки-мишени, включающему: контакт композиции, включающей клетку-мишень, с клеткой, экспрессирующей CAR, где: (a) CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD), отличной от CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD, связываемую CAR-рецептором.

[92.] Способу уничтожения клетки-мишени, включающему: контакт композиции, включающей клетку-мишень, с клеткой, экспрессирующей CAR, где: (a) CAR включает: (i) антигенную детерминанту (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает Адаптер, включающий: (i) первый домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с AD-мишенью, и (ii) второй домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП.

[93.] Способу согласно любому из [77]-[79], [81]-[83], [85]-[87] или [89]-[91], где клетка-мишень экспрессирует CD123.

[94.] Способу согласно любому из [80], [84], [88] или [92], где клетка-мишень экспрессирует AD-мишень.

[95.] Способу согласно любому из [77]-[94], где D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-32 и 338-33, 99 и 100.

[96.] Способу согласно любому из [77]-[94], где D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33.

[97.] Способу согласно любому из [77]-[94], где D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

[98.] Способу согласно любому из [77]-[97], где трансмембранный домен включает трансмембранный домен CD8a, 41BB или CD28.

[99.] Способу согласно любому из [77]-[98], где внутриклеточный сигнальный домен выбран из группы, состоящей из домена альфа, бета или дзета-цепи T-клеточного рецептора человека; домена 41BB человека; домена CD28 человека; и их любой комбинации.

[100.] Способу согласно любому из [77]-[99], где внутриклеточный сигнальный домен включает внутриклеточный домен костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, 41BB, OX40, CD30, CD40, PD1, лимфоцитарного функционально-ассоциированного антигена 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, NKG2D, B7-H3, лиганда, специфично связывающегося с CD83, и их любой комбинации.

[101.] Способу согласно любому из [77]-[94], где CAR, включающий D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62-66 или 67.

[102.] Способу согласно любому из [77]-[94], где CAR, включающий D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67.

[103.] Способу согласно любому из [77]-[102], где AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-43 и 44.

[104.] Способу согласно любому из [77]-[103], где AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37.

[105.] Способу согласно любому из [77]-[103], где AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

[106.] Способу согласно любому из [77]-[105], где ADBD, который связывается с AD p26 АФП, включает scFv, который связывается с AD p26 АФП.

[107.] Способу согласно любому из [77]-[105], где ADBD, который связывается с AD p26 АФП, включает D-домен, который связывается с AD p26 АФП.

[108.] Способу согласно [107], где D-домен, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94.

[109.] Способу согласно [107], где D-домен, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70-73 или 92-94.

[110.] Способу согласно [107], где D-домен, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73.

[111.] Способу согласно [107], где CAR, включающий D-домен, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

[112.] Способу согласно [107], где CAR, включающий D-домен, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69.

[113.] Способу согласно любому из [77]-[112], где CAR включает ADBD, который связывается с AD, отличной от CD123, причем ADBD связывается с опухолевым антигеном.

[114.] Способу согласно [113], где опухолевый антиген выбран из группы: BCMA, CD19, CD22, CS1, HER2, TACI, BAFFR и PDL1.

[115.] Способу согласно [113], где опухолевый антиген представляет собой ВСМА.

[116.] Способу согласно [113], где опухолевый антиген представляет собой CD19.

[117.] Способу согласно [113], где опухолевый антиген выбран из группы: CD45, CD26, CD30, CD33 и CD38.

[118.] Способу согласно любому из [77]-[117], где Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50-54 или 55.

[119.] Способу согласно любому из [77]-[117], где Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50.

[120.] Способу согласно любому из [77]-[117], где Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56-60 или 61.

[121.] Способу согласно любому из [77]-[117], где Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61.

[122.] Способу согласно любому из [77]-[121], где AD-мишень выбрана из: CD45, CD26, CD30, CD33 и CD38.

[123.] Способу согласно любому из [77]-[121], где AD-мишень выбрана из: CD19, CD22, CD123, ВСМА, CS1, HER2, TACI, BAFFR и PDL1.

[124.] Способу согласно любому из [77]-[121], где AD-мишень представляет собой ВСМА.

[125.] Способу согласно любому из [77]-[121], где AD-мишень представляет собой CD19.

[126.] Способу согласно любому из [77]-[125], где клетка, экспрессирующая CAR, является иммунной клеткой.

[127.] Способу согласно [126], где клетка, экспрессирующая CAR, является иммунной эффекторной клеткой.

[128.] Способу согласно [126], где клетка, экспрессирующая CAR, является Т-клеткой.

[129.] Способу согласно [126], где клетка, экспрессирующая CAR, является естественной киллерной (NK) клеткой.

[130.] Способу согласно любому из [77]-[129], где клетка-мишень является раковой клеткой.

[131.] Способу согласно [130], где клетка-мишень является клеткой острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), клеткой миелодисплазии, клеткой В-клеточного острого лимфобластного лейкоза, клеткой волосатоклеточного лейкоза, клеткой лимфомы Ходжкина или клеткой бластной плазмоцитоидной дендритно-клеточной неоплазии (БПДКН).

[132.] Способу согласно [130], где клетка-мишень является клеткой острого

миелоидного лейкоза (ОМЛ).

[133.] Способу согласно любому из [77]-[132], где контакт происходит в организме пациента-человека.

[134.] Способу согласно [133], включающему введение пациенту-человеку клетки, экспрессирующей CAR, и Адаптера в любом порядке.

[135.] Способу согласно [133], включающему введение пациенту-человеку Адаптера, где пациенту-человеку была введена клетка, экспрессирующая CAR.

[136.] Способу согласно [133], включающему введение пациенту-человеку Адаптера, где пациент-человек включает клетку, экспрессирующую CAR.

[137.] Способу доставки иммунного ответа к клетке-мишени у пациента, включающему: введение пациенту клетки, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен.

[138.] Способу уничтожения клетки-мишени у нуждающегося в этом пациента, включающему: введение пациенту клетки, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен.

[139.] Способу согласно [137] или [138], где клетка-мишень экспрессирует CD123.

[140.] Способу согласно любому из [137]-[139], где клетка-мишень является раковой клеткой.

[141.] Способу согласно [140], где клетка-мишень является клеткой острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), клеткой миелодисплазии, клеткой В-клеточного острого лимфобластного лейкоза, клеткой волосатоклеточного лейкоза, клеткой лимфомы Ходжкина или клеткой бластной плазмоцитоидной дендритно-клеточной неоплазии (БПДКН), предпочтительно клеткой острого миелоидного лейкоза (ОМЛ).

[142.] Способу истощения лимфоцитов у нуждающегося в этом пациента, включающему: введение пациенту клетки, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен.

[143.] Способу согласно [142], где лимфоциты экспрессируют CD123.

[144.] Способу согласно [142] или [143], где лимфоциты представляют собой В-лимфоциты.

[145.] Способу лечения рака, включающему: введение нуждающемуся в этом пациенту клетки, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен.

[146.] Способу согласно [145], где рак представляет собой гемобластоз.

[147.] Способу согласно [146], где гемобластоз представляет собой острый лейкоз, хронический лейкоз, истинную полицитемию, лимфому, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема,

болезнь тяжелых цепей, миелодиспластический синдром (например, миелодиспластический синдром высокого риска), волосатоклеточный лейкоз или миелодисплазию.

[148.] Способу согласно [146], где гемобластоз представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), миелодиспластический синдром (например, миелодиспластический синдром высокого риска), В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, лимфому Ходжкина или бластную плазмоцитоидную дендритно-клеточную неоплазию (БПДКН).

[149.] Способу согласно [146], где гемобластоз представляет собой ОМЛ.

[150.] Способу согласно [146], где гемобластоз представляет собой БПДКН.

[151.] Способу лечения аутоиммунного заболевания или нарушения, включающему: введение нуждающемуся в этом пациенту клетки, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен.

[152.] Способу согласно [146], где аутоиммунное заболевание или нарушение представляет собой красную волчанку.

[153.] Способу согласно любому из [137]-[152], где D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-32 и 338-33, 99 и 100.

[154.] Способу согласно любому из [137]-[152], где D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33.

[155.] Способу согласно любому из [137]-[152], где D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

[156.] Способу согласно любому из [137]-[155], где трансмембранный домен включает трансмембранный домен CD8a, 41BB или CD28.

[157.] Способу согласно любому из [137]-[156], где внутриклеточный сигнальный домен выбран из группы, состоящей из домена альфа, бета или дзета-цепи Т-клеточного рецептора человека; домена 41BB человека; домена CD28 человека; и их любой комбинации.

[158.] Способу согласно любому из [137]-[157], где внутриклеточный сигнальный домен включает внутриклеточный домен костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, 41BB, OX40, CD30, CD40, PD1, лимфоцитарного функционально-ассоциированного антигена 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, NKG2D, B7-H3, лиганда, специфично связывающегося с CD83, и их любой комбинации.

[159.] Способу согласно любому из [137]-[152], где CAR, включающий D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62-66 или 67.

[160.] Способу согласно любому из [137]-[152], где CAR, включающий D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:

67.

[161.] Способу согласно любому из [137]-[160], где клетка, экспрессирующая CAR, является иммунной клеткой.

[162.] Способу согласно [161], где клетка, экспрессирующая CAR, является иммунной эффекторной клеткой.

[163.] Способу согласно [161], где клетка, экспрессирующая CAR, является Т-клеткой.

[164.] Способу согласно [161], где клетка, экспрессирующая CAR, является естественной киллерной (NK) клеткой.

[165.] Способу согласно любому из [137]-[164], где введение клетки, экспрессирующей CAR, включает введение фармацевтической композиции, включающей клетку, экспрессирующую CAR.

[166.] Способу доставки иммунного ответа к клетке-мишени у пациента, включающему: введение пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD р26 АФП.

[167.] Способу уничтожения клетки-мишени у нуждающегося в этом пациента, включающему: введение пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD р26 АФП.

[168.] Способу согласно [166] или [167], где клетка-мишень экспрессирует CD123.

[169.] Способу согласно любому из [166]-[168], где клетка-мишень является раковой клеткой.

[170.] Способу согласно [168], где клетка-мишень является клеткой острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), клеткой миелодисплазии, клеткой В-клеточного острого лимфобластного лейкоза, клеткой волосатоклеточного лейкоза, клеткой лимфомы Ходжкина или клеткой бластной плазмцитойдендритно-клеточной неоплазии (БПДКН), предпочтительно клеткой острого миелоидного лейкоза (ОМЛ).

[171.] Способу истощения лимфоцитов у нуждающегося в этом пациента, включающему: введение пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD р26 АФП.

[172.] Способу согласно [171], где лимфоциты экспрессируют CD123.

[173.] Способу согласно [171] или [172], где лимфоциты представляют собой В-лимфоциты.

[174.] Способу лечения рака, включающему: введение нуждающемуся в этом пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD р26 АФП.

[175.] Способу согласно [174], где рак представляет собой гемобластоз.

[176.] Способу согласно [175], где гемобластоз представляет собой острый лейкоз, хронический лейкоз, истинную полицитемию, лимфому, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей, миелодиспластический синдром (например,

миелодиспластический синдром высокого риска), волосатоклеточный лейкоз или миелодисплазию.

[177.] Способу согласно [175], где гемобластоз представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), миелодиспластический синдром (например, миелодиспластический синдром высокого риска), В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, лимфому Ходжкина или бластную плазмцитотидную дендритно-клеточную неоплазию (БПДКН)

[178.] Способу согласно [175], где гемобластоз представляет собой ОМЛ.

[179.] Способу согласно [175], где гемобластоз представляет собой БПДКН.

[180.] Способу лечения аутоиммунного заболевания или нарушения, включающему: введение нуждающемуся в этом пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD p26 АФП.

[181.] Способу согласно [180], где аутоиммунное заболевание или нарушение представляет собой красную волчанку.

[182.] Способу согласно любому из [166]-[181], где пациенту была введена клетка, экспрессирующая CAR, где CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен.

[183.] Способу согласно любому из [166]-[181], где пациент включает клетку, экспрессирующую CAR, где CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен.

[184.] Способу согласно любому из [166]-[181], дополнительно включающему введение клетки, экспрессирующей CAR, где, CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен.

[185.] Способу доставки иммунного ответа к клетке-мишени у пациента, включающему: введение пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП.

[186.] Способу уничтожения клетки-мишени у нуждающегося в этом пациента, включающему: введение пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП.

[187.] Способу согласно [185] или [186], где клетка-мишень экспрессирует CD123.

[188.] Способу согласно любому из [185]-[187], где клетка-мишень является раковой клеткой.

[189.] Способу согласно [187], где клетка-мишень является клеткой острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), клеткой миелодисплазии, клеткой В-клеточного острого лимфобластного лейкоза, клеткой волосатоклеточного лейкоза, клеткой лимфомы

Ходжкина или клеткой бластной плазмочитоидной дендритно-клеточной неоплазии (БПДКН), предпочтительно клеткой острого миелоидного лейкоза (ОМЛ).

[190.] Способу истощения лимфоцитов у нуждающегося в этом пациента, включающему: введение пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП.

[191.] Способу согласно [190], где лимфоциты экспрессируют CD123.

[192.] Способу согласно [190] или [191], где лимфоциты представляют собой В-лимфоциты.

[193.] Способу лечения рака, включающему: введение нуждающемуся в этом пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП.

[194.] Способу согласно [193], где рак представляет собой гемобластоз.

[195.] Способу согласно [194], где гемобластоз представляет собой острый лейкоз, хронический лейкоз, истинную полицитемию, лимфому, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей, миелодиспластический синдром (например, миелодиспластический синдром высокого риска), волосатоклеточный лейкоз или миелодисплазию.

[196.] Способу согласно [194], где гемобластоз представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), миелодиспластический синдром (например, миелодиспластический синдром высокого риска), В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, лимфому Ходжкина или бластную плазмочитоидную дендритно-клеточную неоплазию (БПДКН).

[197.] Способу согласно [194], где гемобластоз представляет собой ОМЛ.

[198.] Способу согласно [194], где гемобластоз представляет собой БПДКН.

[199.] Способу лечения аутоиммунного заболевания или нарушения, включающему: введение нуждающемуся в этом пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП.

[200.] Способу согласно [199], где аутоиммунное заболевание или нарушение представляет собой красную волчанку.

[201.] Способу согласно любому из [185]-[200], где пациенту была введена клетка, экспрессирующая CAR, где: (a) CAR включает: (i) антигенную детерминанту (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен.

[202.] Способу согласно любому из [185]-[200], где пациент включает клетку, экспрессирующую CAR, где: (a) CAR включает: (i) антигенную детерминанту (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен.

[203.] Способу согласно любому из [185]-[200], дополнительно включающему

введение клетки, экспрессирующей CAR, где: (a) CAR включает: (i) антигенную детерминанту (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен.

[204.] Способу доставки иммунного ответа к клетке-мишени у пациента, включающему: введение пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD, связываемую CAR-рецептором, где пациенту была введена клетка, экспрессирующая CAR, где: (a) CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD), отличной от CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен.

[205.] Способу уничтожения клетки-мишени у нуждающегося в этом пациента, включающему: введение пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD, связываемую CAR-рецептором, где пациенту была введена клетка, экспрессирующая CAR, где: (a) CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD), отличной от CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен, где пациенту была введена клетка, экспрессирующая CAR, где: (a) CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD), отличной от CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен.

[206.] Способу согласно [204] или [205], где клетка-мишень экспрессирует CD123.

[207.] Способу согласно любому из [204]-[206], где клетка-мишень является раковой клеткой.

[208.] Способу согласно [206], где клетка-мишень является клеткой острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), клеткой миелодисплазии, клеткой В-клеточного острого лимфобластного лейкоза, клеткой волосатоклеточного лейкоза, клеткой лимфомы Ходжкина или клеткой бластной плазмоцитоидной дендритно-клеточной неоплазии (БПДКН), предпочтительно клеткой острого миелоидного лейкоза (ОМЛ).

[209.] Способу истощения лимфоцитов у нуждающегося в этом пациента, включающему: введение пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD, связываемую CAR-рецептором, где пациенту была введена клетка, экспрессирующая CAR, где: (a) CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD), отличной от CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен.

[210.] Способу согласно [209], где лимфоциты экспрессируют CD123.

[211.] Способу согласно [209] или [210], где лимфоциты представляют собой В-лимфоциты.

[212.] Способу лечения рака, включающему: введение нуждающемуся в этом пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD, связываемую CAR-рецептором, где пациенту была введена клетка, экспрессирующая CAR, где: (a) CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD), отличной от CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен.

[213.] Способу согласно [212], где рак представляет собой гемобластоз.

[214.] Способу согласно [213], где гемобластоз представляет собой острый лейкоз, хронический лейкоз, истинную полицитемию, лимфому, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей, миелодиспластический синдром (например, миелодиспластический синдром высокого риска), волосатоклеточный лейкоз или миелодисплазию.

[215.] Способу согласно [213], где гемобластоз представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), миелодиспластический синдром (например, миелодиспластический синдром высокого риска), В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, лимфому Ходжкина или бластную плазмцитотидную дендритно-клеточную неоплазию (БПДКН).

[216.] Способу согласно [213], где гемобластоз представляет собой ОМЛ.

[217.] Способу согласно [213], где гемобластоз представляет собой БПДКН.

[218.] Способу лечения аутоиммунного заболевания или нарушения, включающему: введение нуждающемуся в этом пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD, связываемую CAR-рецептором, где пациенту была введена клетка, экспрессирующая CAR, где: (a) CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD), отличной от CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен.

[219.] Способу согласно [218], где аутоиммунное заболевание или нарушение представляет собой красную волчанку.

[220.] Способу доставки иммунного ответа к клетке-мишени у пациента, включающему: введение пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD, связываемую CAR-рецептором, где пациент включает клетку, экспрессирующую CAR, где: (a) CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD), отличной от CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен.

[221.] Способу уничтожения клетки-мишени у нуждающегося в этом пациента, включающему: введение пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD, связываемую CAR-рецептором, где пациент включает клетку, экспрессирующую CAR, где: (a) CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD), отличной от CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен.

[222.] Способу согласно [220] или [221], где клетка-мишень экспрессирует CD123. Можем ли мы включить способ по любому из [220]-[222], где клетка-мишень является эндотелиальной клеткой?

[223.] Способу согласно любому из [220]-[222], где клетка-мишень является раковой клеткой, или где клетка-мишень является эндотелиальной клеткой.

[224.] Способу согласно [222], где клетка-мишень является клеткой острого

миелоидного лейкоза (ОМЛ), клеткой миелодисплазии, клеткой В-клеточного острого лимфобластного лейкоза, клеткой волосатоклеточного лейкоза, клеткой лимфомы Ходжкина или клеткой бластной плазмцитойдендритно-клеточной неоплазии (БПДКН), предпочтительно клеткой острого миелоидного лейкоза (ОМЛ).

[225.] Способу истощения лимфоцитов у нуждающегося в этом пациента, включающему: введение пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD, связываемую CAR-рецептором, где пациент включает клетку, экспрессирующую CAR, где: (a) CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD), отличной от CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен.

[226.] Способу согласно [225], где лимфоциты экспрессируют CD123.

[227.] Способу согласно [225] или [226], где лимфоциты представляют собой В-лимфоциты.

[228.] Способу лечения рака, включающему: введение нуждающемуся в этом пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD, связываемую CAR-рецептором, где пациент включает клетку, экспрессирующую CAR, где: (a) CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD), отличной от CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен.

[229.] Способу согласно [228], где рак представляет собой гемобластоз.

[230.] Способу согласно [229], где гемобластоз представляет собой острый лейкоз, хронический лейкоз, истинную полицитемию, лимфому, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей, миелодиспластический синдром (например, миелодиспластический синдром высокого риска), волосатоклеточный лейкоз или миелодисплазию.

[231.] Способу согласно [229], где гемобластоз представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), миелодиспластический синдром (например, миелодиспластический синдром высокого риска), В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, лимфому Ходжкина или бластную плазмцитойдендритно-клеточную неоплазию (БПДКН).

[232.] Способу согласно [229], где гемобластоз представляет собой ОМЛ.

[233.] Способу согласно [229], где гемобластоз представляет собой БПДКН.

[234.] Способу лечения аутоиммунного заболевания или нарушения, включающему: введение нуждающемуся в этом пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD, связываемую CAR-рецептором, где пациент включает клетку, экспрессирующую CAR, где: (a) CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD), отличной от CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен.

[235.] Способу согласно [234], где аутоиммунное заболевание или нарушение

представляет собой красную волчанку.

[236.] Способу доставки иммунного ответа к клетке-мишени у пациента, включающему: введение пациенту Адаптера, включающего: (i) первый домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBBD), который связывается с AD-мишенью, и (ii) второй домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП.

[237.] Способу уничтожения клетки-мишени у нуждающегося в этом пациента, включающему: введение пациенту Адаптера, включающего: (i) первый домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBBD), который связывается с AD-мишенью, и (ii) второй домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП.

[238.] Способу согласно [236] или [237], где клетка-мишень экспрессирует AD-мишень

[239.] Способу согласно любому из [236]-[238], где клетка-мишень является раковой клеткой.

[240.] Способу истощения лимфоцитов у нуждающегося в этом пациента, включающему: введение пациенту Адаптера, включающего: (i) первый домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBBD), который связывается с AD-мишенью, и (ii) второй домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП.

[241.] Способу согласно [240], где лимфоциты экспрессируют AD-мишень.

[242.] Способу согласно [240] или [241], где лимфоциты представляют собой В-лимфоциты или Т-лимфоциты.

[243.] Способу лечения рака, включающему: введение нуждающемуся в этом пациенту Адаптера, включающего: (i) первый домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBBD), который связывается с AD-мишенью, и (ii) второй домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП.

[244.] Способу согласно [243], где рак представляет собой гемобластоз.

[245.] Способу согласно [244], где гемобластоз представляет собой острый лейкоз, хронический лейкоз, истинную полицитемию, лимфому, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей, миелодиспластический синдром (например, миелодиспластический синдром высокого риска), волосатоклеточный лейкоз или миелодисплазию.

[246.] Способу согласно [244], где гемобластоз представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), миелодиспластический синдром (например, миелодиспластический синдром высокого риска), В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, лимфому Ходжкина или бластную плазмоцитоидную дендритно-клеточную неоплазию (БПДКН).

[247.] Способу согласно [244], где гемобластоз представляет собой ОМЛ.

[248.] Способу согласно [244], где гемобластоз представляет собой БПДКН.

[249.] Способу лечения аутоиммунного заболевания или нарушения, включающему: введение нуждающемуся в этом пациенту Адаптера, включающего: (i) первый домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с AD-мишенью, и (ii) второй домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП.

[250.] Способу согласно [249], где аутоиммунное заболевание или нарушение представляет собой ревматоидный артрит.

[251.] Способу согласно любому из [236]-[250], где пациенту была введена клетка, экспрессирующая CAR, где CAR включает: (i) антигенную детерминанту (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен.

[252.] Способу согласно любому из [236]-[250], где пациент включает клетку, экспрессирующую CAR, где CAR включает: (i) антигенную детерминанту (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен.

[253.] Способу согласно любому из [236]-[250], дополнительно включающему введение клетки, экспрессирующей CAR, где CAR включает: (i) антигенную детерминанту (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен.

[254.] Способу согласно любому из [166]-[253], где D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-32 и 338-33, 99 и 100.

[255.] Способу согласно любому из [166]-[253], где D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33.

[256.] Способу согласно любому из [166]-[253], где D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

[257.] Способу согласно любому из [166]-[256], где трансмембранный домен включает трансмембранный домен CD8a, 41BB или CD28.

[258.] Способу согласно любому из [166]-[257], где внутриклеточный сигнальный домен выбран из группы, состоящей из домена альфа, бета или дзета-цепи T-клеточного рецептора человека; домена 41BB человека; домена CD28 человека; и их любой комбинации.

[259.] Способу согласно любому из [166]-[258], где внутриклеточный сигнальный домен включает внутриклеточный домен костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, 41BB, OX40, CD30, CD40, PD1, лимфоцитарного функционально-ассоциированного антигена 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, NKG2D, B7-H3, лиганда, специфично связывающегося с CD83, и их любой комбинации.

[260.] Способу согласно любому из [166]-[259], где AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-43 и 44.

[261.] Способу согласно любому из [166]-[260], где AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37.

[262.] Способу согласно любому из [166]-[260], где AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

[263.] Способу согласно любому из [166]-[262], где ADBD, который связывается с AD p26 АФП, включает scFv, который связывается с AD p26 АФП.

[264.] Способу согласно любому из [166]-[262], где ADBD, который связывается с AD p26 АФП, включает D-домен, который связывается с AD p26 АФП.

[265.] Способу согласно [264], где D-домен, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94.

[266.] Способу согласно [264], где D-домен, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70-73 или 92-94.

[267.] Способу согласно [264], где D-домен, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73.

[268.] Способу согласно [264], где CAR, включающий D-домен, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

[269.] Способу согласно [264], где CAR, включающий D-домен, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69.

[270.] Способу согласно любому из [166]-[269], где CAR включает ADBD, который связывается с AD, отличной от CD123, причем ADBD связывается с опухолевым антигеном.

[271.] Способу согласно [270], где опухолевый антиген выбран из группы: BCMA, CD19, CD22, CS1, HER2, TACI, BAFFR и PDL1.

[272.] Способу согласно [270], где опухолевый антиген представляет собой BCMA.

[273.] Способу согласно [270], где опухолевый антиген представляет собой CD19.

[274.] Способу согласно [270], где опухолевый антиген выбран из группы: CD45, CD26, CD30, CD33 и CD38.

[275.] Способу согласно любому из [166]-[274], где Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50-54 или 55.

[276.] Способу согласно любому из [166]-[274], где Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50.

[277.] Способу согласно любому из [166]-[274], где Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56-60 или 61.

[278.] Способу согласно любому из [166]-[274], где Адаптер, включающий: (i) D-

домен, который связывается с CD123, и (ii) AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61.

[279.] Способу согласно любому из [166]-[278], где AD-мишень выбрана из: CD45, CD26, CD30, CD33 и CD38.

[280.] Способу согласно любому из [166]-[278], где AD-мишень выбрана из: CD19, CD22, CD123, BCMA, CS1, HER2, TACI, BAFFR и PDL1.

[281.] Способу согласно любому из [166]-[278], где AD-мишень представляет собой BCMA.

[282.] Способу согласно любому из [166]-[278], где AD-мишень представляет собой CD19.

[283.] Способу согласно любому из [166]-[278], где AD-мишень представляет собой CD45.

[284.] Способу согласно любому из [166]-[278], где клетка, экспрессирующая CAR, является иммунной клеткой.

[285.] Способу согласно [284], где клетка, экспрессирующая CAR, является иммунной эффекторной клеткой.

[286.] Способу согласно [284], где клетка, экспрессирующая CAR, является Т-клеткой.

[287.] Способу согласно [284], где клетка, экспрессирующая CAR, является естественной киллерной (NK) клеткой.

[288.] Способу согласно любому из [166]-[287], где клетка-мишень является раковой клеткой.

[289.] Способу согласно [288], где клетка-мишень является клеткой острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), клеткой миелодисплазии, клеткой В-клеточного острого лимфобластного лейкоза, клеткой волосатоклеточного лейкоза, клеткой лимфомы Ходжкина или клеткой бластной плазмоцитоидной дендритно-клеточной неоплазии (БПДКН).

[290.] Способу согласно [288], где клетка-мишень является клеткой острого миелоидного лейкоза (ОМЛ).

[291.] Способу согласно любому из [166]-[290], где клетку, экспрессирующую CAR, и Адаптер вводят отдельно в любом порядке.

[292.] Способу согласно любому из [166]-[291], где введение Адаптера включает введение фармацевтической композиции, включающей Адаптер.

[293.] Способу согласно любому из [166]-[291], где введение Адаптера и клетки, экспрессирующей CAR, включает введение фармацевтической композиции, включающей Адаптер, и фармацевтической композиции, включающей клетку, экспрессирующую CAR.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0014] Фигура 1. Скрининг мутантов 8W9C в виде слитых МВР. Различные клоны мутантов 8W9C (мутант 8W9C) подвергали скринингу с помощью ИФА на связывание с CD123 (связывание CD123) и экспрессию (связывание МВР). Одну или более копий дикого

типа (8W9C), высокой аффинности (5B7L), низкой аффинности (5S5W) и несвязывающих (a3D) контролей исследовали для сравнения.

[0015] Фигура 2. Связывание CD123 мутантов 8W9C в виде слитых MBP. Мутанты 8W9C (6Z5E и 4H2H) исследовали с помощью ИФА на связывание с CD123 (связывание CD123). Контроли дикого типа (8W9C), высокой аффинности (5B7L) и низкой аффинности (5S5W) исследовали для сравнения.

[0016] Фигура 3. Связывание CD123 мутантов 8W9C в виде слитых MBP. Мутант 8W9C (1J1K) исследовали с помощью ИФА на связывание с CD123 (связывание CD123). Контроли дикого типа (8W9C), высокой аффинности (5B7L) и низкой аффинности (5S5W) исследовали для сравнения.

[0017] Фигура 4. Связывание клеток мутантами 6T1D в качестве Адаптеров. Различные варианты 6T1D мутантов исследовали при различных концентрациях с помощью проточной цитометрии на связывание с CD123-экспрессирующими клетками OCI-AML2. Связывание измеряли по средней интенсивности флуоресценции (MFI).

[0018] Фигура 5. Активация NFAT CAR-T-клеток белками spgX. JNL10/8G8V-CAR исследовали на активацию в присутствии CD123-экспрессирующих клеток-мишеней MOLM13 и различных концентраций CD123-специфичных белков Адаптеров. Образцы включали аффинно модифицированные варианты 6T1D (например, 3F4N и 4R8U). Исходный D-домен (6T1D) и несвязывающие (a3D) контроли исследовали для сравнения.

[0019] Фигура 6. Активация NFAT CAR-T-клеток, культивируемых с CD123-специфичными белками Адаптерами. JNL10/8G8V-CAR исследовали на активацию в присутствии клеток MOLM13, не экспрессирующих CD123 (MOLM13 (CD123-/-)), и различных концентраций белков spgX. Образцы включали аффинно модифицированные варианты 6T1D (например, 3F4N и 4R8U). Исходный D-домен (6T1D) и несвязывающие (a3D) контроли исследовали для сравнения.

[0020] Фигура 7. Продукция IL-2 CAR-T-клетками, культивируемыми с CD123-специфичными белками Адаптерами. Первичные Т-клетки, экспрессирующие 8G8V-CAR, исследовали на предмет экспрессии IL-2 в присутствии клеток-мишеней MOLM13 и различных концентраций белков Адаптеров. Образцы включали аффинно модифицированные варианты 6T1D (например, 3F4N и 4R8U). Исходный D-домен (6T1D) и несвязывающие (a3D) контроли исследовали для сравнения.

[0021] Фигура 8. Продукция IFN γ CAR-T-клетками, культивируемыми с CD123-специфичными белками Адаптерами. Первичные Т-клетки, экспрессирующие 8G8V-CAR, исследовали на предмет экспрессии IFN γ в присутствии клеток-мишеней MOLM13 и различных концентраций белков Адаптеров. Образцы включали аффинно модифицированные варианты 6T1D (например, 3F4N и 4R8U). Исходный D-домен (6T1D) и несвязывающие (a3D) контроли исследовали для сравнения.

[0022] Фигура 9. Активация NFAT 8G8V-CAR Т-клеток, культивируемых с CD123-специфичными белками Адаптерами и клетками-мишенями. JNL10/8G8V-CAR исследовали для активации в присутствии клеток-мишеней MOLM13 и различных

концентраций белков Адаптеров. Образцы включали аффинно модифицированные варианты 6T1D (например, 3F4N, 4R8U, 0C8S и 5B1Q). Исходный D-домен (6T1D) и несвязывающие (a3D) контроли исследовали для сравнения.

[0023] Фигура 10. Лизис клеток-мишеней 8G8V-CAR Т-клетками, культивируемыми с CD123-специфичными белками Адаптерами. Исследовали лизис клеток-мишеней MOLM13 первичными 8G8V-CAR Т-клетками в присутствии различных концентраций белков Адаптеров. Образцы включали аффинно модифицированные варианты 6T1D (например, 3F4N, 4R8U, 0C8S и 5B1Q). Исходный D-домен (6T1D) и несвязывающие (a3D) контроли исследовали для сравнения.

[0024] Фигура 11. Продукция IFN γ 8G8V-CAR Т-клетками. Первичные 8G8V-CAR Т-клетки исследовали с помощью ИФА на предмет продукции IFN γ в присутствии клеток-мишеней MOLM13 и различных концентраций CD123-специфичного белка Адаптера. Образцы включали аффинно модифицированные варианты 6T1D (например, 3F4N, 4R8U, 0C8S и 5B1Q). Исходный D-домен (6T1D) и несвязывающие (a3D) контроли исследовали для сравнения.

[0025] Фигура 12. Продукция IL-2 8G8V-CAR Т-клетками. Первичные 8G8V-CAR Т-клетки исследовали с помощью ИФА на предмет продукции IL-2 в присутствии клеток-мишеней MOLM13 и различных концентраций CD123-специфичного белка Адаптера. Образцы включали аффинно модифицированные варианты 6T1D (например, 3F4N, 4R8U, 0C8S и 5B1Q). Исходный D-домен (6T1D) и несвязывающие (a3D) контроли исследовали для сравнения.

[0026] Фигура 13. Лизис клеток-мишеней 8G8V-CAR Т и CD123-специфичными белками Адаптерами. NALM6-CD123+ клетки подвергались лизису первичными 8G8V-CAR Т-клетками в присутствии различных концентраций белков Адаптеров. Образцы включали как моновалентные, так и бивалентные форматы белков Адаптеров, состоящих из низкоаффинного (4G0D), высокоаффинного (5B1Q) и исходного D-домена (6T1D). Несвязывающие (a3D) контроли исследовали для сравнения.

[0027] Фигура 14. Эффективность *in vivo* Dd-X CD123-специфичного D-домена оценивали с использованием модели опухоли MOLM14-GFP/Luciferase. Заштрихованная область указывает на отмену Адаптера Dd-X. q.o.d. через день; q.d. каждый день.

[0028] Фигура 15. Эффективность *in vivo* Dd-X CD123-специфичного D-домена оценивали с использованием модели диссеминированной опухоли MV4-11. Заштрихованная область указывает на отмену Адаптера Dd-X. q.d. каждый день.

[0029] Фигура 16. Модели с ксенотрансплантатами, полученными у пациентов с ОМЛ.

[0030] Фигура 17. Dd-X CD123-специфичный D-домен обеспечивает устранение или контроль множества ксенотрансплантатов, полученных у пациентов с ОМЛ. Показан процент живых клеток в костном мозге, которые представляли собой трансплантированные клетки ОМЛ (hCD45+CD3-) после лечения.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0031] Заголовки разделов, используемые в настоящем описании, предназначены лишь для организационных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие описанное изобретение каким-либо образом.

Определение терминов

[0032] Следует понимать, что во всех случаях, когда в настоящем изобретении варианты осуществления описаны с использованием термина "включающий", также предусмотрены аналогичные в других отношениях варианты осуществления, описанные с использованием терминов "состоящий из" и/или "состоящий по существу из". Однако при использовании в формуле изобретения в качестве переходных фраз каждую из них следует интерпретировать отдельно и в соответствующем юридическом и фактическом контексте (например, "включающий" считается скорее открытой фразой, тогда как "состоящий из" является более исключительной, а "состоящий по существу из" занимает промежуточное положение).

[0033] В настоящем изобретении формы единственного числа включают формы множественного числа, если не указано иное.

[0034] Термин "и/или", используемый в настоящем изобретении в такой фразе, как "А и/или В", включает А и В; А или В; А (одно); и В (одно). Аналогичным образом, термин "и/или", используемый в такой фразе, как "А, В и/или С", охватывает каждый из следующих вариантов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (одно); В (одно); и С (одно).

[0035] Подразумевается, что "приблизительно" при использовании этого термина в настоящем изобретении, в случае отношения к измеримому значению, такому как количество, продолжительность и другие измеримые значения, известные из уровня техники, охватывает вариации $\pm 20\%$ или, в некоторых вариантах осуществления, $\pm 10\%$, или, в некоторых вариантах осуществления, $\pm 5\%$, или, в некоторых вариантах осуществления, $\pm 1\%$, или, в некоторых вариантах осуществления, $\pm 0,1\%$ от указанного значения, если такие изменения подходят для осуществления раскрытых способов.

[0036] Химерный антигенный рецептор или "CAR", или "CAR-рецепторы" при использовании в настоящем изобретении относятся к сконструированному рецептору, который придает специфичность по отношению к антигену или мишени клетке (например, Т-клеткам, таким как интактные Т-клетки, центральные Т-клетки памяти, эффекторные Т-клетки памяти, НК-клетки, НКТ-клетки или их комбинация). CAR-рецепторы также известны как искусственные Т-клеточные рецепторы, химерные Т-клеточные рецепторы или химерные иммунорецепторы.

[0037] Термин "Адаптер" при использовании в настоящем изобретении относится к мультидоменному растворимому белку, включающему антигенную детерминанту (AD) и домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), где ADBД связывается со второй AD. В дополнение к AD и ADBД Адаптер может включить дополнительный AD, дополнительный ADBД и/или другие дополнительные домены.

[0038] Термин "домен, связывающий антигенную детерминанту" или "ADBД" при

использовании данного термина в настоящем изобретении относится к последовательности полипептида (например, Адаптера или CAR), которая является достаточной, чтобы обеспечивать распознавание и специфичное связывание с антигенной детерминантой-мишенью (AD). В некоторых вариантах осуществления ADBD представляет собой антигенсвязывающий фрагмент антитела, scFv или антигенсвязывающий пептид, который не основан на последовательности антитела или фрагмента антитела (например, D-домен или аффитело). В некоторых вариантах осуществления ADBD включает связывающий каркас не на основе антитела (например, D-домен, аффитело, домен фибронектина, нанотело, домен липокалина, домен анкирина, макситело, домен белка А или домен аффилина). В некоторых вариантах осуществления ADBD представляет собой D-домен. В некоторых вариантах осуществления ADBD представляет собой связывающую последовательность на основе антитела. В некоторых вариантах осуществления ADBD представляет собой scFv или доменное антитело (dAb). В некоторых вариантах осуществления ADBD обладает способностью связываться с антигеном-мишенью на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления ADBD обладает способностью связываться с антигеном-мишенью на поверхности иммунной эффекторной клетки. В некоторых вариантах осуществления ADBD обладает способностью связывать рецептор фактора роста, иммунорегуляторный рецептор или рецептор гормона.

[0039] В конкретных вариантах осуществления ADBD представляет собой полипептидную последовательность на основе неиммуноглобулинового каркаса, которая является достаточной, чтобы обеспечить распознавание и специфичное связывание с антигенной детерминантой-мишенью. В некоторых вариантах осуществления ADBD не на основе антитела представляет собой полипептид, который обладает способностью связываться с антигеном-мишенью на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления ADBD не на основе антитела обладает способностью связывать рецептор фактора роста, иммунорегуляторный рецептор или рецептор гормона. В некоторых вариантах осуществления ADBD представляет собой полипептид на основе D-домена. В конкретных вариантах осуществления ADBD представляет собой полипептид на основе D-домена, который является достаточным, чтобы обеспечить распознавание и специфичное связывание с антигенной детерминантой-мишенью. В некоторых вариантах осуществления ADBD представляет собой полипептид на основе D-домена, который обладает способностью связываться с антигеном-мишенью на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления ADBD представляет собой полипептид на основе D-домена, который обладает способностью связывать рецептор фактора роста, иммунорегуляторный рецептор или рецептор гормона. В некоторых вариантах осуществления ADBD представляет собой полипептид на основе D-домена, который обладает способностью связывать антиген-мишень на сывороточном белке.

[0040] Термин "D-домен" относится к мешень-связывающему полипептиду, который имеет некоторую общую последовательность и некоторые общие структурные признаки с референсной каркасной последовательностью: MGSWAEFKQRLAAIK

TRLQALGGSEAELAAFEKEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEALRK EAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO: 2) (см. заявки WO 2016/164305 и WO 2016/164308, каждая из которых включена в настоящее описание посредством отсылки во всей полноте). Референсный каркас является вариантом неприродного и не содержащего мишень референсного полипептида с антипараллельным трехспиральным пучком, первоначально сконструированным для исследования фолдинга белков (см. публикацию Walsh et al., PNAS 96: 5486-5491 (1999), полностью включенную в настоящее описание путем ссылки). Несмотря на то, что референсный каркас не обладает какой-либо известной мишень-связывающей активностью, было обнаружено, что полипептиды, содержащие модификации референсного каркаса, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, способны специфично связывать представляющие интерес мишени. Таким образом, D-домен или молекула, включающая D-домен, может специфично (нерандомизированно) связываться с молекулой-мишенью. Без ограничения теорией, считается, что при конструировании D-домена структурные ограничения поверхностных остатков (которые могут быть модифицированы) позволяют им специфично связывать представляющую интерес мишень. В некоторых вариантах осуществления D-домен обычно состоит из 70-75 аминокислотных остатков. В некотором варианте осуществления D-домен включает аминокислотную последовательность, которая отличается (например, из-за аминокислотных модификаций) от последовательности референсного каркаса, имеющего последовательность SEQ ID NO: 2, присутствием до 20 замен. В конкретных вариантах осуществления D-домен не содержит последовательность LAAIKTRLQ (SEQ ID NO: 49).

[0041] Термины "белок" и "полипептид" используются в настоящем изобретении взаимозаменяемо для обозначения биологического полимера, содержащего звенья из остатков аминокислот, соединенных пептидными связями; белок может состоять из двух или более полипептидных цепей.

[0042] Термины "антитело" или "иммуноглобулин", используемые в настоящем изобретении взаимозаменяемо, включают полноразмерные антитела и фрагменты антител, включая любой функциональный домен антитела, такой как антигенсвязывающий фрагмент или его отдельные цепи, эффекторный домен, эпитоп связывания рецептора реутилизации или их часть. Типичное антитело включает по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем изобретении VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем изобретении VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, CL. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на гипервариабельные области, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередующимися с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FW). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FW, расположенных от

N-конца к С-концу в следующем порядке: FW1, CDR1, FW2, CDR2, FW3, CDR3, FW4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, в том числе различными клетками иммунной системы (например, эффекторными клетками) и первым компонентом (C1q) классической системы комплемента. Примеры антител согласно настоящему изобретению включают типичные антитела, scFv и их комбинации, в которых, например, DDpp ковалентно связан (например, пептидными связями или через химический линкер) с N-концом тяжелой цепи и/или легкой цепи типичного цельного (полноразмерного) антитела, или интеркалирован в H-цепи и/или L-цепи полноразмерного антитела.

[0043] Термин "фрагмент антитела" относится к части интактного антитела и относится к любому функциональному домену антитела, такому как антигенсвязывающий фрагмент или его отдельные цепи, эффекторный домен или его часть, а также эпитоп связывания рецептора реутилизации или их часть. Примеры фрагментов антител включают, без ограничения, Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv-фрагменты, линейные антитела, одноцепочечные антитела и мультиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител. "Фрагмент антитела" в настоящем изобретении включает антигенсвязывающий участок или эпитопсвязывающий участок. В одном варианте осуществления слитый белок DDpp включает эффекторный домен или его часть. В одном варианте осуществления слитый белок DDpp включает эпитоп связывания рецептора реутилизации или его часть.

[0044] Термины "одноцепочечный вариабельный фрагмент(ы)" или "scFv" антитела при использовании в настоящем изобретении относятся к формам антител (например, фрагментам антител), включающим вариабельные области только тяжелой и легкой цепей, соединенные пептидным линкером. scFv может включать VL-линкер-VH или может включить VH-линкер-VL. Антитела ScFv обычно имеют длину 220-250 аминокислот и содержат линкеры длиной 10-25 аминокислот. В одном варианте осуществления слитый белок DDpp включает DDpp и scFv.

[0045] Следует понимать, что при использовании в настоящем изобретении термин "Fc-область" или просто "Fc" означает C-концевую часть константной области цепи иммуноглобулина, предпочтительно константной области тяжелой цепи иммуноглобулина, или ее часть. Например, Fc-область иммуноглобулина может включать: (1) домен CH1, домен CH2 и домен CH3, (2) домен CH1 и домен CH2, (3) домен CH1 и домен CH3, 4) домен CH2 и домен CH3 или (5) комбинацию двух или более доменов и шарнирную область иммуноглобулина. Таким образом, в различных вариантах осуществления Fc относится к двум последним доменам константной области иммуноглобулина IgA, IgD и IgG и последним трем доменам константной области иммуноглобулина IgE и IgM, а также к гибкому шарниру на N-конце от этих доменов. В случае IgA и IgM, Fc может включать J-цепь. В случае IgG, Fc включает домены иммуноглобулина C γ 2 и C γ 3 и шарнирную область между C γ 1 и C γ 2. В предпочтительном варианте осуществления Fc-область иммуноглобулина включает, по меньшей мере, шарнирную область иммуноглобулина,

домен CH2 и домен CH3 и предпочтительно не содержит домен CH1. В одном варианте осуществления класс иммуноглобулина, из которого происходит константная область тяжелой цепи, представляет собой IgG (Ig γ) (γ подклассы 1, 2, 3 или 4). Могут использоваться другие классы иммуноглобулинов: IgA (Ig α), IgD (Ig δ), IgE (Ig ϵ) и IgM (Ig μ). Хотя границы Fc-области могут различаться, Fc-область тяжелой цепи IgG человека, как обычно определяют, включает остатки C226 или p260 на C-конце, при этом нумерация соответствует индексу EU, как описано в публикации Кабата (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5 th Ed. Public Health Service, NIH, Bethesda, Md. (1991)). Fc может относиться к этой области при выделении или к этой области в контексте полноразмерного антитела, фрагмента антитела или Fc-слитого белка. Полиморфизмы наблюдали в ряде различных положений Fc, включая, без ограничения, положения 270, 272, 312, 315, 356 и 358, пронумерованные согласно индексу EU, и, таким образом, могут присутствовать небольшие различия между представленной последовательностью и последовательностями в предшествующем уровне техники. Выбор подходящей константной области тяжелой цепи иммуноглобулина подробно обсуждается в патентах США 5,541,087 и 5,726,044, которые полностью включены в настоящее описание путем ссылки. Считается, что выбор конкретных последовательностей константной области тяжелой цепи определенных классов и подклассов иммуноглобулинов для достижения конкретного результата находится в рамках квалификации специалистов в данной области. Часть конструкции ДНК, кодирующей Fc-область иммуноглобулина, предпочтительно включает, по меньшей мере, часть шарнирного домена и, предпочтительно, по меньшей мере, часть CH3-домена Fc-гамма или гомологичных доменов в любом из IgA, IgD, IgE или IgM. Кроме того, предполагается, что замена или делеция аминокислот в константных областях тяжелой цепи иммуноглобулина может быть полезной при практической реализации способов и композиций, раскрытых в настоящем изобретении. Одним из примеров может быть введение аминокислотных замен в верхнюю область CH2 для создания варианта Fc с пониженной аффинностью к Fc-рецепторам (Cole, J. Immunol. 159: 3613 (1997)).

[0046] "Антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" или "ADCC" относится к клеточно-опосредованной реакции, при которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют Fc-рецепторы (FcR) (например, естественные киллеры (NK-клетки), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на клетке-мишени и затем вызывают лизис клетки-мишени (или другие цитотоксические эффекты). Для оценки ADCC активности молекулы, представляющей интерес, может использоваться любой анализ ADCC *in vitro*, известный в уровне техники, например, как описано в патентах США 5,500,362 или 5,821,337. Эффекторные клетки, полезные для таких анализов, включают, без ограничения, мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) и естественные киллеры (NK-клетки). Альтернативно или дополнительно ADCC активность представляющей интерес молекулы можно оценивать *in vivo*, например, в модели на животных, такой как описанная в публикации Clynes et al. PNAS

95:652656 (1998).

[0047] Термины "линкер", "спейсер" и "шарнир" используются в настоящем изобретении взаимозаменяемо для обозначения пептидной или другой химической связи, расположенной между двумя или более, в других отношениях независимыми, функциональными доменами слитого белка DDpp, Адаптера или CAR. Например, линкер может быть расположен между доменом антигенной детерминанты (AD) и доменом, связывающим антигенную детерминанту (ADBД), Адаптера. Аналогичным образом, линкер может быть расположен между двумя доменами, связывающими антигенные детерминанты, или антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом CAR. В некоторых вариантах осуществления линкер является пептидной или другой химической связью, расположенной между DDpp и другим полипептидом слитого белка DDpp. Подходящие линкеры для соединения двух или более доменов Адаптера описаны в настоящем изобретении и/или иначе в иных отношениях ясны специалисту в данной области.

[0048] Термин "функционально связанный" при использовании в настоящем изобретении означает, что две молекулы соединены таким образом, что каждая сохраняет по меньшей мере некоторый уровень функциональной активности, который каждая молекула имела в отдельности (при условии, что каждая молекула обладает функциональной активностью). В вариантах осуществления, когда одна молекула не имела функциональной активности, она функционально связана с другой молекулой, если другая молекула сохраняет по меньшей мере некоторый уровень своей функциональной активности. Функционально связанный также может относиться к соединению двух нефункциональных молекул. Две молекулы могут быть "функционально связаны" независимо от того, соединены ли они непосредственно или опосредованно (например, через линкер).

[0049] Термины "специфично связывается", "обладает селективной аффинностью", "связывается" или "связывающий" используются взаимозаменяемо и означают, что связывающее средство, такое как DDpp, реагирует или связывается более часто, быстрее, с большей длительностью, с большей аффинностью или с некоторой комбинацией вышеперечисленного с эпитопом, белком или молекулой-мишенью, чем с альтернативными веществами, в том числе белками, которые не относятся к эпитопу-мишени, белку или молекуле-мишени. Вследствие идентичности последовательностей гомологичных белков у разных биологических видов специфичное связывание в некоторых вариантах осуществления может включать связывающее средство, которое распознает белок или мишень больше чем у одного вида. Аналогичным образом, из-за гомологии в некоторых областях полипептидных последовательностей различных белков специфичное связывание может включать связывающее средство, которое распознает больше одного белка или мишени. Следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления связывающее средство, которое специфично связывает первую мишень, может специфично связывать или не связывать вторую мишень. Таким образом, "специфичное связывание" не

требует обязательно (хотя оно может включать) исключительного связывания, например связывания с одной мишенью. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления связывающее средство может специфично связывать больше одной мишени. В некоторых вариантах осуществления несколько мишеней могут быть связаны одним и тем же антигенсвязывающим сайтом связывающего средства.

[0050] "Мишень" относится к любой молекуле или комбинации молекул, которые могут быть связаны DDpp, например, слитым белком DDpp, другим компонентом слитого белка DDpp, таким как антитело или фрагмент вариабельного домена антитела, адаптером или CAR, или компонентом слитого белка DDpp, адаптера или CAR, таким как домен, связывающий антигенную детерминанту.

[0051] Термины "эпитоп" и "антигенная детерминанта" используются в настоящем изобретении взаимозаменяемо и относятся к той части любой молекулы (например, представляющей интерес мишени, такой как CD123 или p26 АФП), которая может распознаваться и специфично связываться конкретным связывающим средством (например, DDpp или антителом). Если распознаваемая молекула представляет собой полипептид, эпитопы могут образовываться из смежных аминокислот и несмежных аминокислот и/или других химически активных поверхностных групп молекул (таких как углеводы), которые совмещаются при укладке третичной структуры белка. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, обычно сохраняются при денатурации белка, тогда как эпитопы, образованные в результате третичной укладки, обычно теряются при денатурации белка. Эпитоп обычно включает по меньшей мере 3 аминокислоты и обычно по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

[0052] Термин "пептидная метка" при использовании в настоящем изобретении относится к пептидной последовательности, которая является частью другого белка или присоединена (например, посредством генной инженерии) к другому белку для обеспечения функции полученной слитой конструкции. Пептидные метки обычно относительно короткие по сравнению с белком, с которым они слиты; например, в некоторых вариантах осуществления пептидные метки имеют длину четыре или больше аминокислот, например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 25 или больше аминокислот. В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок, который содержит пептидную метку. В других вариантах осуществления DDpp специфично связывает пептидную метку. Из уровня техники известны многочисленные пептидные метки, которые имеют применения, представленные в настоящем изобретении. Примеры пептидных меток, которые могут быть компонентом слитого белка DDpp или мишенью, связываемой DDpp (например, слитым белком DDpp), включают, без ограничения, HA (гемагглютинин), с-тус, гликопротеин D вируса простого герпеса (gD), T7, GST, GFP, MBP, Strep-метки, His-метки, Muc-метки, TAP-метки и метку FLAG® (Eastman Kodak, Rochester, N.Y.). Аналогичным образом, антитела к эпитопу метки обеспечивают обнаружение и локализацию слитого белка с использованием методов, известных в данной области, таких как Вестерн-блоттинг, иммуноферментные анализы и иммуноокрашивание клеток.

[0053] "Полученный из" при использовании этого термина в настоящем изобретении указывает на отношение между первой и второй молекулой. Обычно это относится к структурному подобию между первой молекулой и второй молекулой и не означает или включает процесс или исходное ограничение на первую молекулу, полученную из второй молекулы. Например, в случае внутриклеточного сигнального домена, полученного из молекулы CD3 дзета, внутриклеточный сигнальный домен сохраняет достаточную структуру CD3 дзета, при этом он обладает необходимой функцией, а именно, способностью генерировать сигнал при подходящих условиях. Это не означает или не включает ограничение в отношении конкретного способа получения внутриклеточного сигнального домена, например, это не означает, что для получения внутриклеточного сигнального домена нужно начать с последовательности CD3 дзета и удалить нежелательную последовательность или ввести мутации, чтобы получить внутриклеточный сигнальный домен.

[0054] Термин "природный" при использовании в отношении биологических материалов, таких как молекулы нуклеиновых кислот, полипептиды, антигенные детерминанты и клетки-хозяева, относится к тем, которые существуют в природе и не изменены человеком. С другой стороны, "неприродный" или "синтетический" при использовании в отношении биологических материалов относится к тем, которые не обнаружены в природе и которые были изменены человеком.

[0055] Используемый в настоящем изобретении термин "модификации" в отношении последовательности референсной последовательности включает замены, делеции, вставки и/или добавления последовательности соответствующего аминокислотного положения референсной последовательности (например, DD, раскрытого в настоящем изобретении).

[0056] "Замена" в отношении последовательности референсной последовательности относится к замене конкретного аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком в соответствующем аминокислотном положении референсной последовательности.

[0057] "Консервативная" аминокислотная замена представляет собой замену, при которой один аминокислотный остаток заменяют другим аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. В уровне техники определены семейства аминокислотных остатков, имеющих аналогичные боковые цепи, которые включают: основные боковые цепи (например, лизин (K), аргинин (R), гистидин (H)), кислотные боковые цепи (например, аспарагиновую кислоту (D), глутаминовую кислоту (E)), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин (G), аспарагин (N), глутамин (Q), серин (S), треонин (T), тирозин (Y), цистеин (C)), неполярные боковые цепи (например, аланин (A), валин (V), лейцин (L), изолейцин (I), пролин (P), фенилаланин (F), метионин (M), триптофан (W)), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин (T), валин (V), изолейцин (I)) и ароматические боковые цепи (например, тирозин (Y), фенилаланин (F), триптофан (W), гистидин (H)). Например, замена тирозина на фенилаланин является

консервативной заменой. В конкретных вариантах осуществления консервативные замены в последовательностях DDpp приводят к изменению или не приводят к изменению специфичного связывания DDpp, содержащего замену, с представляющей интерес мишенью (например, CD123 или p26 АФП), с которой он связывается. В одном варианте консервативные замены в последовательностях DDpp не нарушают связывание DDpp, содержащего замену, с представляющей интерес мишенью, с которой он связывается. Способы идентификации консервативных замен нуклеотидов и аминокислот и неконсервативных замен, которые придают, изменяют или сохраняют селективную аффинность связывания, известны в уровне техники (см., например, Brummell, Biochem. 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi, Protein Eng. 12(10): 879-884 (1999) и Burks, PNAS 94: 412-417 (1997)).

[0058] "Неконсервативная" аминокислотная замена представляет собой замену, при которой один аминокислотный остаток заменяют другим аминокислотным остатком, не имеющим сходную боковую цепь. В одном варианте осуществления неконсервативные замены в последовательностях DDpp приводят к специфичному связыванию DDpp, содержащего замену, с представляющей интерес мишенью (например, CD123 или p26 АФП), с которой он связывается. В одном варианте осуществления неконсервативные замены в последовательностях DDpp не нарушают связывание DDpp, содержащего замену, с представляющей интерес мишенью, с которой он связывается. В одном варианте осуществления неконсервативные замены в последовательностях DDpp, Адаптера или CAR приводят к сохранению специфичного связывания DDpp, Адаптера или CAR, содержащего замену, с представляющей интерес мишенью, с которой он связывается.

[0059] "Неприродные аминокислоты", "аналоги аминокислот" и "нестандартные аминокислотные остатки" используются в настоящем изобретении взаимозаменяемо. Неприродные аминокислоты, которые могут быть заменены в DDpp, представленном в настоящем изобретении, известны из уровня техники. В одном варианте осуществления неприродная аминокислота представляет собой 4-гидроксипролин, которым может быть заменен пролин; 5-гидроксилизин, которым может быть заменен лизин; 3-метилгистидин, которым может быть заменен гистидин; гомосерин, которым может быть заменен серин; и орнитин, которым может быть заменен лизин. Дополнительные примеры неприродных аминокислот, которые могут быть заменены в DDpp, раскрытом в настоящем изобретении, включают, без ограничения, такие молекулы, как: D-изомеры обычных аминокислот, 2,4-диаминомасляную кислоту, альфа-аминоизомасляную кислоту, А-аминомасляную кислоту, Abu, 2-аминомасляную кислоту, гамма-Abu, эпсилон-Ahx, 6-аминогексановую кислоту, Aib, 2-аминоизомасляную кислоту, 3-аминопропионовую кислоту, орнитин, норлейцин, норвалин, гидроксипролин, саркозин, цитруллин, гомоцитруллин, цистеиновую кислоту, т-бутилглицин, т-бутилаланин, фенилглицин, циклогексилаланин, бета-аланин, лантионин, дегидроаланин, γ -аминомасляную кислоту, селеноцистеин и пирролизин, фтораминокислоты, сконструированные аминокислоты, такие как бета-метиламинокислоты, C-альфа-метиламинокислоты и N-альфа-метиламинокислоты или

комбинации неприродных аминокислот. Дополнительные неприродные аминокислоты могут включать, например, 4-аминомасляную кислоту, 4-амино-3-гидрокси-5-фенилпентановую кислоту, 4-амино-3-гидрокси-6-метилгептановую кислоту, 2-тиенилаланин и/или D-изомеры аминокислот. Как обсуждается в настоящем изобретении, в некоторых вариантах осуществления неприродные аминокислоты или аналоги аминокислот могут включать делецию одной или более аминокислот в последовательности.

[0060] Термины "полинуклеотид" и "нуклеиновая кислота", используемые взаимозаменяемо в настоящем изобретении, относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, рибонуклеотидов или дезоксирибонуклеотидов. Эти термины включают, без ограничения, ДНК, РНК, кДНК (комплементарную ДНК), мРНК (матричную РНК), рРНК (рибосомную РНК), мшРНК (малую шпилечную РНК), мяРНК (малую ядерную РНК), мякРНК (малую ядрышковую РНК), микроРНК (мкРНК), геномную ДНК, синтетическую ДНК, синтетическую РНК и/или тРНК. В некоторых вариантах осуществления выделенный полинуклеотид представляет собой модифицированную мРНК, включающую нуклеозиды или нуклеотиды неприродного происхождения. В некоторых вариантах осуществления модифицированная мРНК включает 2-тиоуридин, псевдоуридин или 1-метилпсевдуридин.

[0061] Термины "вектор", "клонированный вектор" и "вектор экспрессии" при использовании в настоящем изобретении относятся к носителю, с помощью которого последовательность нуклеиновой кислоты (например, раскрытая кодирующая последовательность DDpp, Адаптера или CAR) может поддерживаться или амплифицироваться в клетке-хозяине (например, клонирующий вектор) или может быть введена в клетку-хозяина для трансформации хозяина и стимуляции экспрессии (например, транскрипции и трансляции) введенной последовательности. К векторам относятся плазмиды, фаги, вирусы и т.д.

[0062] "Клетка-хозяин" включает отдельную клетку или культуру клеток, которая может быть или была реципиентом нуклеиновых кислот, кодирующих раскрытые DDpp, Адаптер или CAR. Клетки-хозяева включают, без ограничения, клетки бактерий, дрожжей, растений, животных и млекопитающих. Клетки-хозяева включают потомство одной клетки-хозяина, при этом такое потомство не должно быть обязательно полностью идентичным (по морфологии или общей кДНК) исходной родительской клетке вследствие естественной, случайной или направленной мутации и/или изменения. Клетка-хозяин включает клетки, трансфицированные или инфицированные *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo* нуклеиновыми кислотами, кодирующими раскрытые DDpp, Адаптер или CAR. В некоторых примерах клетка-хозяин способна экспрессировать и экспонировать раскрытый DDpp или CAR на своей поверхности, как, например, при фаговом дисплее или в CAR T-клетке. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин способна экспрессировать Адаптер. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин способна экспрессировать и секретировать Адаптер. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин способна экспрессировать CAR. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин способна экспрессировать и экспонировать CAR на своей поверхности. "Экспрессия" включает

транскрипцию и/или трансляцию.

[0063] В настоящем изобретении термины "твердая подложка", "носитель", "матрицы" и "смолы" используются взаимозаменяемо и относятся, без ограничения, к любой колонке (или материалу колонки), грануле, пробирке, микротитровальному планшету, твердой частице (например, агарозе или сефарозе), микрочипу (например, кремниевому, кремний-стеклянному или золотому чипу) или мембране (например, биологической или фильтрующей мембране), к которым DDpp, антитело или другой белок могут быть присоединены (например, соединены, связаны или прикреплены) непосредственно или опосредованно (например, через другие промежуточные партнеры по связыванию, такие как другие антитела или белок А), или в которые могут быть встроены DDpp или антитело (например, посредством рецептора или канала). Реагенты и методы прикрепления полипептидов к твердым подложкам (например, матрицам, смолам, пластику и т.д.) хорошо известны в данной области. Подходящие твердые носители включают, без ограничения, хроматографическую смолу или матрицу (например, агарозные гранулы SEPHAROSE-4 FF), стенку или дно лунки в пластиковом микротитровальном планшете, биочип на основе диоксида кремния, полиакриламид, агарозу, диоксид кремния, нитроцеллюлозу, бумагу, пластик, нейлон, металл и их комбинации. DDpp и другие композиции могут быть прикреплены к материалу-носителю посредством нековалентной ассоциации или ковалентного связывания с использованием реагентов и методов, известных в данной области. В одном варианте осуществления DDpp связывают с хроматографическим материалом при использовании линкера.

[0064] При использовании в настоящем изобретении термины "фармацевтически приемлемый" или "физиологически переносимый" и их грамматические варианты, в случае, если они относятся к композициям, носителям, разбавителям и реагентам, используются взаимозаменяемо и означают, что материалы можно вводить человеку или наносить на кожу человека без возникновения терапевтически неприемлемых нежелательных физиологических эффектов, таких как тошнота, головокружение, расстройство желудка и т.п.

[0065] "Парентеральное" введение иммуногенной композиции включает, например, подкожную (п/к), внутривенную (в/в), внутримышечную (в/м) или внутригрудинную инъекцию или инфузию.

[0066] "Модулировать" означает коррекцию или регулирование амплитуды, частоты, степени или активности. В другом родственном аспекте такая модуляция может быть положительно модулируемой (например, повышением частоты, степени или активности) или отрицательно модулируемой (например, снижением частоты, степени или активности). В некоторых вариантах осуществления модуляция в положительном или отрицательном направлении относится к функции клетки, ткани или органа до введения терапевтического средства. В дополнительных вариантах осуществления модуляция в положительном или отрицательном направлении относится к нормальной, здоровой клетке, ткани или органу.

[0067] "Эффективное количество" DDpp (такого как слитый белок DDpp), CAR-клетки, Адаптера и/или композиции CAR-клетки/Адаптера, раскрытых в настоящем изобретении, является количеством, достаточным для достижения конкретно заявленной цели, такой как вызвать наблюдаемое изменение уровня одной или более биологических активностей, связанных с мишенью, с которой связывается DDpp (например, слитый белок DDpp), CAR-клетка и/или Адаптер. В некоторых вариантах осуществления изменение повышает уровень активности мишени. В других вариантах осуществления изменение снижает уровень активности мишени. "Эффективное количество" может быть определено эмпирически и стандартным способом в соответствии с заявленной целью. Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству DDpp (например, слитого белка DDpp), CAR-клетки и/или адаптера или другого терапевтического средства, эффективного для "лечения" (например, уменьшения симптомов) заболевания или нарушения у субъекта (млекопитающего). Термин "терапевтически эффективное количество" также относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения требуемого профилактического результата.

[0068] "Пациент", "субъект", "животное" и "млекопитающее" используются взаимозаменяемо и относятся к млекопитающим, таким как пациенты-люди и приматы, не относящиеся к человеку, а также к экспериментальным животным, таким как кролики, крысы и мыши, и другие животные. К животным относятся все позвоночные, например, млекопитающие и немлекопитающие, такие как куры, амфибии и рептилии. "Млекопитающее" при использовании в настоящем изобретении относится к любому представителю класса Млекопитающих, включающих, без ограничения, человека и приматов, не относящихся к человеку, таких как шимпанзе, а также другие виды человекообразных обезьян и других обезьянообразных; сельскохозяйственных животных, таких как крупный рогатый скот, овцы, свиньи, козы и лошади; домашних млекопитающих, таких как собаки и кошки; лабораторных животных, включая грызунов, таких как мыши, крысы и морские свинки и т.п. В конкретном варианте осуществления пациентом является человек. Данный термин не означает конкретный возраст или пол. Таким образом, этот термин подразумевает взрослых и новорожденных субъектов, а также эмбрионы и плоды мужского или женского пола.

[0069] Термины "лечить" и "лечение" при использовании в настоящем изобретении относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам, целью которых является предупреждение или замедление (уменьшение или задержка) симптомов, осложнений или биохимических признаков заболевания, состояния или нарушения, облегчение симптомов или остановка или замедление дальнейшего развития заболевания, состояния или нарушения. Лечение может быть профилактическим (для предотвращения или задержки начала заболевания или предотвращения проявления его клинических или субклинических симптомов) или терапевтическим подавлением или облегчением симптомов после проявления заболевания, состояния или нарушения,

направленным на патологическое состояние, предотвращение патологического состояния, преследование или получение положительных результатов или снижение вероятности развития у пациента такого состояния, даже если лечение в конечном итоге окажется неудачным. Нуждающиеся в лечении включают лиц, которые уже страдают этим заболеванием, а также тех, кто склонен к этому заболеванию, или тех, у кого это заболевание нужно предотвратить. Лечение могут проводить с использованием слитого белка DDpp, CAR-клетки, Адаптера и/или композиции CAR-клетки/Адаптера, отдельно или в комбинации с дополнительным терапевтическим средством. В некоторых вариантах осуществления термины "лечить" и "лечение" используются в настоящем изобретении для обозначения терапевтического лечения и профилактических или превентивных мер, целью которых является предупреждение или замедление (уменьшение или задержка) симптомов, осложнений или биохимических признаков пролиферативного нарушения, или улучшение одного или более симптомов (предпочтительно одного или более различных симптомов) пролиферативного нарушения. В конкретных вариантах осуществления термины "лечить" и "лечение" относятся к улучшению по меньшей мере одного измеряемого физического параметра пролиферативного нарушения, такого как рост опухоли, не обязательно различимый пациентом. В других вариантах осуществления термины "лечить" и "лечение" относятся к ингибированию прогрессирования пролиферативного нарушения, либо физически, например, путем стабилизации различного симптома, либо физиологически, например, путем стабилизации физического параметра, или обоими способами. В других вариантах осуществления термины "лечить" и "лечение" относятся к уменьшению или стабилизации размера опухоли, пролиферации или выживания опухолевых клеток, или количества раковых клеток.

[0070] "Рак", "опухоль" или "злокачественное новообразование" используются как синонимы и относятся к любому из различных заболеваний, которые характеризуются неконтролируемой, аномальной пролиферацией клеток, способностью пораженных клеток распространяться локально или через кровоток и лимфатическую систему в другие части тела (метастазировать), а также любому из различных характерных структурных и/или молекулярных особенностей. "Опухоль" при использовании в настоящем изобретении относится к росту и пролиферации неопластических клеток, как злокачественному, так и доброкачественному, а также ко всем предраковым и раковым клеткам и тканям. Под "раковой опухолью" или "злокачественной клеткой" подразумевается клетка, имеющая специфические структурные свойства, без дифференцировки и способная к инвазии и метастазированию. Злокачественные опухоли, которые можно лечить с применением слитого белка DDpp, клетки CAR, Адаптера и/или композиции CAR-клетки/Адаптера, предложенной в настоящем изобретении, включают, без ограничения перечисленными, рак молочной железы, легкого, головного мозга, шейки матки, кожи, костей, печени, поджелудочной железы, толстой и прямой кишки, почки, головы и шеи, яичника, кроветворной ткани (например, лейкоз) и предстательной железы, а также лимфому. Другие типы рака и опухолей, которые можно лечить с применением слитого белка DDpp, CAR-

клетки, Адаптера и/или композиции CAR-клетки/Адаптера, описаны в настоящем изобретении или иным образом известны в уровне техники. При ссылке на рак, опухоли или опухолевые клетки конкретного "типа" подразумевается рак, опухоли или опухолевые клетки, характеризующиеся конкретным заболеванием. Например, в некоторых вариантах осуществления первый и второй рак одного и того же типа представляют собой смешанно-клеточную лимфому Ходжкина и богатую лимфоцитами лимфому Ходжкина. В других вариантах осуществления первый и второй рак одного и того же типа представляют собой острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) из предшественников В-клеток и ОЛЛ из зрелых В-клеток. Примеры первого и второго рака разных типов включают, например, лимфому Ходжкина и ОЛЛ.

[0071] Термин "опухолевый антиген" относится к антигену, который является характерным для конкретного гиперпролиферативного заболевания, такого как рак. Термины "опухолевый антиген" или "раковый антиген" используются в настоящем изобретении взаимозаменяемо. В некоторых аспектах антигены происходят из злокачественных опухолей, включающих, без ограничения, первичную или метастатическую меланому, тимому, лимфому, саркому, рак легкого (например, НМРЛ или МРЛ), рак печени, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, лейкозы, множественную миелому, глиобластому, нейробластому, рак матки, рак шейки матки, рак почки, рак щитовидной железы, рак мочевого пузыря, рак почки, мезотелиому, а также аденокарциномы, такие как рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак толстой кишки и другие формы рака, известные в уровне техники. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), острый В-клеточный лимфобластный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, лимфому Ходжкина или бластную плазмоцитоидную дендритно-клеточную неоплазию (БПДКН). В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой острый В-клеточный острый лимфобластный лейкоз ("В-ОЛЛ"), Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз ("Т-ОЛЛ"), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ); один или более хронических лейкозов, включая, без ограничения, хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ); дополнительные гематологические онкологические заболевания или гематологические состояния, включающие, без ограничения, В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, бластную плазмоцитоидную дендритно-клеточную неоплазию, лимфому Беркитта, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, волосатоклеточный лейкоз, мелкоклеточную или крупноклеточную фолликулярную лимфому, злокачественные лимфолиферативные состояния, MALT-лимфому, мантийноклеточную лимфому, лимфому из клеток маргинальной зоны, множественную миелому, миелодисплазию и миелодиспластический синдром (например, миелодиспластический синдром высокого риска), неходжкинскую лимфому, плазмобластную лимфому, плазмоцитоидную дендритно-клеточную неоплазию, макроглобулинемию Вальденстрема.

[0072] Опухолевые и раковые антигены могут быть дополнительно определены как "опухолеспецифические антигены (ОСА)", "ракоспецифические антигены (РСА)", "опухолеассоциированные антигены (ОАА)" или "ракоассоциированные антигены (РАА)". ОСА - это антиген, который уникален для опухолевых клеток и не встречается в других клетках организма. ОАА - это антиген, который присутствует как на опухолевых, так и на некоторых нормальных клетках. ОАА может экспрессироваться на нормальных клетках в условиях, которые не могут вызывать состояние иммунологической толерантности к антигену. Экспрессия ОАА на опухоли может происходить в условиях, которые позволяют иммунной системе отвечать на антиген. ОАА могут экспрессироваться на нормальных клетках во время развития плода, когда иммунная система незрелая и не способна реагировать, или они могут естественно присутствовать на чрезвычайно низких уровнях на нормальных клетках, но при этом будут экспрессироваться на гораздо более высоких уровнях на опухолевых клетках. Из-за динамического характера опухолей, в некоторых случаях опухолевые клетки могут экспрессировать уникальные антигены на некоторых стадиях, а на других стадиях также могут экспрессировать антигены, которые также экспрессируются неопухолевыми клетками. Таким образом, включение определенного маркера в качестве ОАА не исключает того, что он может считаться ОСА. В некоторых вариантах осуществления ОАА и/или ОСА, которые содержат антигенную детерминанту, специфически связываемую CAR-клеткой, Адаптером и/или композицией CAR-клетки/Адаптера, представленной в настоящем изобретении, выбраны из: BCMA, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, IL3Ra, CD70, CD123, CD171 (L1-CAM), CS1, EGFRvIII, GD2, Lewis^Y, ROR 1, мезотелина, IL13Ra2, cMet, PSMA, рецептора фолата альфа (FR-альфа), CEA, ErbB2 (HER-2/neu); EGFR (HER), PSCA, PSA, MUC1, MUC16, CD44v6, CD44v6/7, CD44v7/8, CD55, IL11Ra, EphA2, EGP40, TAG72, CAIX, HMW-MAA (CSPG4), MAGEA4, лигандов NKG2D, бета-HCG, гликолипида F77, HLA-A2 (NY-ESO-1), HMW-MAA, GD3, TCR, MAGE A3, MART1, WT1, тиреоглобулин, gp100 (Pmel 17), тирозиназы, TRP1, TRP2, HLA-A1, MAGE1, MAGE3, BAGE, GAGE1, GAGE2, p15, p53, Ras, BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR; VEGFR2, FAP, FAR, EBVA, антигена ВПЧ E6, антигена ВПЧ E7, TSP-180, MAGE4, MAGE5, MAGE6, RAGE, p185erbB2, p180erbB3, nm-23H1, CA 19-9, CA72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, бета-катенина, CDK4, Mum-1, p15, p16, 43-9F, альфа-фетопротеина, BCA225, BTAA, CA125, CA 15-3, CA 27.29(BCAA), CA195, CA242, CA50, CAM43, CD68, CO-029, FGF5, G250, HTgp-175, M344, MA50, MG7-Ag, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, M2BP, TAAL6, TLP, TPS, FcRH5, GPCR5d, LILBR4, CLL1 и FLT3.

[0073] Термин "аутоиммунное заболевание" при использовании в настоящем изобретении определен как нарушение, которое возникает в результате аутоиммунного ответа. Аутоиммунное заболевание является результатом неадекватного и чрезмерного ответа на аутоантиген. Примеры аутоиммунных заболеваний включают, без ограничения, болезнь Аддисона, гнездную алопецию, анкилозирующий спондилит, аутоиммунный гепатит, аутоиммунный паротит, болезнь Крона, диабет (I типа), дистрофический буллезный эпидермолиз, эпидидимит, гломерулонефрит, болезнь Грейвса, синдром

Гийена-Барре, болезнь Хашимото, гемолитическую анемию, системную красную волчанку, рассеянный склероз, миастению, вульгарную пузырчатку, псориаз, ревматическую лихорадку, ревматоидный артрит, саркоидоз, склеродермию, синдром Шегрена, спондилоартропатии, тиреоидит, васкулит, витилиго, микседему, пернициозную анемию, язвенный колит и другие.

[0074] Термин "клетка-мишень" при использовании в настоящем изобретении относится к клетке или клеткам, которые участвуют в заболевании и на которые можно адресно воздействовать DDpp-содержащими композициями или композицией CAR, Адаптера и/или CAR/Адаптера, раскрытой в настоящем изобретении. Клетки-мишени включают любую клетку у субъекта (например, человека или животного), на которую может воздействовать DDPP, CAR, Адаптер и/или композиция CAR/Адаптера. Клетка-мишень может быть клеткой, экспрессирующей или повышенно экспрессирующей мишень, специфично связываемую CAR, Адаптером и/или композицией CAR/Адаптера. Клетка-мишень может быть клеткой, экспрессирующей или повышенно экспрессирующей мишень, специфично связываемую слитым белком DDpp, CAR, Адаптером и/или композицией CAR/Адаптера.

[0075] Термин "аутологичный" при использовании в настоящем изобретении относится к любому материалу, полученному у того же лица, которому его позже будут повторно вводить.

[0076] Термин "аллогенный" при использовании в настоящем изобретении относится к любому материалу, полученному у другого животного того же вида, что и организм, которому этот материал вводят. Два или более лиц являются аллогенными по отношению друг к другу, если гены в одном или больше локусах не являются идентичными. В некоторых аспектах аллогенный материал организмов одного и того же вида может быть генетически в достаточной степени неоднородным для антигенного взаимодействия.

[0077] Термин "эффекторные клетки" при использовании в настоящем изобретении относится к лейкоцитам, которые экспрессируют один или более Fc-рецепторов и выполняют эффекторные функции. Предпочтительно, чтобы клетки экспрессировали по меньшей мере Fc(RIII) и выполняли эффекторную функцию ADCC. Примеры человеческих лейкоцитов, которые опосредуют ADCC, включают мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), естественные киллеры (NK-клетки), моноциты, цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы; причем МКПК и NK-клетки в некоторых вариантах осуществления являются предпочтительными. Эффекторные клетки могут быть выделены из их природного источника, например, из крови или МКПК, как описано в настоящем изобретении или в иных отношениях известно в уровне техники. В конкретном варианте осуществления эффекторные клетки являются человеческими эффекторными клетками.

[0078] Термин "эффекторная функция" относится к специализированной иммунной функции дифференцированной клетки. Эффекторной функцией Т-клетки, например, может быть цитолитическая активность или хелперная активность, в том числе секреция

цитокинов.

[0079] Термин "иммунная клетка" при использовании в настоящем изобретении относится к клеткам иммунной системы млекопитающего, включающим, без ограничения перечисленными, антигенпрезентирующие клетки, В-клетки, базофилы, цитотоксические Т-клетки, дендритные клетки, эозинофилы, гранулоциты, Т-хелперы, лейкоциты, лимфоциты, макрофаги, тучные клетки, клетки памяти, моноциты, естественные киллеры, нейтрофилы, фагоциты, плазматические клетки и Т-клетки.

[0080] Термины "Т-клетка" и "Т-лимфоцит" являются взаимозаменяемыми и используются в настоящем изобретении как синонимы. Примеры включают, без ограничения, наивные Т-клетки, центральные Т-клетки памяти, эффекторные Т-клетки памяти или их комбинации.

[0081] Термин "иммунный ответ" при использовании в настоящем изобретении относится к иммунитету, включающему, без ограничения перечисленным, врожденный иммунитет, гуморальный иммунитет, клеточный иммунитет, иммунитет, воспалительный ответ, приобретенный (адаптивный) иммунитет, аутоиммунитет и/или гиперактивный иммунитет.

[0082] Термин "трансдукция" при использовании в настоящем изобретении относится к введению чужеродной нуклеиновой кислоты в клетку с использованием вирусного вектора. Термин "трансфекция" в настоящем изобретении относится к введению чужеродной нуклеиновой кислоты в клетку с использованием технологии рекомбинантных ДНК. Термин "трансформация" означает введение "чужой" (например, внешней, внеклеточной или иной неэндогенной) последовательности нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) в клетку-хозяина, в результате чего клетка-хозяин будет экспрессировать введенную нуклеиновую кислоту с получением требуемого вещества, такого как белок или фермент, кодируемый введенной кодирующей последовательностью. Введенная последовательность нуклеиновой кислоты также может называться "клонированным" или "чужеродным" геном или последовательностью, может включать регуляторные или контрольные последовательности, такие как последовательности начала, терминации, промотора, сигнала, секреции или другие, используемые генетическим аппаратом клетки. Последовательность нуклеиновой кислоты может включать нефункциональные последовательности или последовательности с неизвестной функцией. Клетка-хозяин, которая принимает и экспрессирует введенную нуклеиновую кислоту (например, ДНК или РНК), была "трансформирована" и является "трансформантом" или "клоном". ДНК или РНК, введенные в клетку-хозяина, могут происходить из любого источника, включая клетки того же рода или вида, что и клетка-хозяин, или клетки другого рода или вида, или могут быть неприродными.

[0083] "Совместно экспрессирует" при использовании в настоящем изобретении относится к экспрессии двух или более кодирующих белок последовательностей одной и той же клеткой или популяцией клеток. Кодирующие последовательности могут быть, например, нуклеиновыми кислотами, каждая из которых кодирует один белок или

химерный белок в виде одной полипептидной цепи.

[0084] "Рецептор клеточной поверхности" относится к молекулам и комплексам молекул, способным принимать сигнал и передавать такой сигнал через плазматическую мембрану клетки. Примером рецептора клеточной поверхности, представленного в настоящем изобретении, является активированный int рецептор эгрина, например, активированный рецептор интегрина $\alpha\text{v}\beta 3$ на метастатической клетке. При использовании в настоящем изобретении "рецептор клеточной поверхности" также включает молекулу, экспрессируемую на клеточной поверхности, которая содержит DDpp , способный связывать представляющую интерес мишень (например, CD123 или p26 АФП). Термин "рецептор" означает клеточно-ассоциированный белок, который связывается с молекулой (например, лигандом) или иным образом взаимодействует с ней и опосредует воздействие лиганда на клетку. В некоторых вариантах осуществления молекула, которая взаимодействует с рецептором, является биоактивной молекулой. Мембраносвязанные рецепторы клеточной поверхности обычно характеризуются мультидоменной структурой, включающей внеклеточный лигандсвязывающий домен, мембраносвязанный домен и внутриклеточный эффекторный домен, который обычно участвует в сигнальной трансдукции.

[0085] "Ускользящие варианты с потерей антигена" в настоящем изобретении относятся к клеткам, которые демонстрируют пониженную экспрессию или потерю экспрессии антигена-мишени, на который нацелен CAR , представленный в настоящем изобретении.

A. Антигенные детерминанты (AD)

[0086] Антигенные детерминанты (AD) представляют собой эпитопы, распознаваемые и специфично связываемые областями, связывающими антигенные детерминанты (ADBD) (например, антигенсвязывающими фрагментами антитела или связывающими доменами с альтернативным каркасом (ASBD) (например, D-доменами)). AD в Адаптерах и на клетках-мишенях, представленных в настоящем изобретении, может связываться CAR -рецепторами, обсуждаемыми ниже.

[0087] В некоторых вариантах осуществления AD (например, в Адаптере и/или на клетке-мишени) представляет собой AD, присутствующий в природном белке или другой молекуле. В некоторых вариантах осуществления AD представляет собой AD, который является эндогенным для человека.

[0088] В некоторых вариантах осуществления AD в Адаптере представляет собой AD, присутствующий на клетке-мишени.

[0089] В некоторых вариантах осуществления AD (например, в Адаптере и/или на клетке-мишени) представляет собой AD, присутствующий в трансмембранном белке, например, AD, присутствующий во внеклеточной части трансмембранного белка. В некоторых вариантах осуществления AD является опухолевым антигеном. В некоторых вариантах осуществления AD является опухолеассоциированным антигеном. В некоторых вариантах осуществления AD является опухолеспецифическим антигеном.

[0090] В некоторых вариантах осуществления АД (например, в Адаптере и/или на клетке-мишени) является раковым антигеном. В некоторых вариантах осуществления АД является ракоассоциированным антигеном. В некоторых вариантах осуществления АД является ракоспецифическим антигеном.

[0091] В некоторых вариантах осуществления АД (например, в Адаптере и/или на клетке-мишени) является эпитопом ВСМА. В некоторых вариантах осуществления АД является эпитопом CD19. В некоторых вариантах осуществления АД является эпитопом CD20. В некоторых вариантах осуществления АД является эпитопом CD22. В некоторых вариантах осуществления АД является эпитопом CD123. В некоторых вариантах осуществления АД является эпитопом CD37. В некоторых вариантах осуществления АД является эпитопом CS1. В других вариантах осуществления АД является эпитопом CS1, который связывается элотузумабом. В некоторых вариантах осуществления АД является эпитопом HER2. В некоторых вариантах осуществления АД является эпитопом АФП. В некоторых вариантах осуществления АД является эпитопом р26 АФП. В некоторых вариантах осуществления АД является эпитопом CD45. В некоторых вариантах осуществления АД является эпитопом CD45 человека, который связывается антителом UCHL-1, А6 или ODP4. В некоторых вариантах осуществления АД является эпитопом CD45 человека, который связывается антителом 4KB5, MB1, KiB3, 2H4 или MT2. В некоторых вариантах осуществления АД является эпитопом CD26. В некоторых вариантах осуществления АД является эпитопом CD30. В некоторых вариантах осуществления АД является эпитопом CD33. В некоторых вариантах осуществления АД является эпитопом CD38.

[0092] В некоторых вариантах осуществления АД является эпитопом CD123. В других вариантах осуществления АД включает 5-25, 5-50, 5-75, 5-100, 5-125 или 5-150 аминокислотных остатков, больше 150 аминокислотных остатков или все аминокислотные остатки SEQ ID NO: 1.

[0093] В некоторых вариантах осуществления АД является эпитопом р26 АФП. В других вариантах осуществления АД включает 5-25, 5-50, 5-75, 5-100, 5-125 или 5-150 аминокислотных остатков, больше 150 аминокислотных остатков или все аминокислотные остатки SEQ ID NO: 37. В других вариантах осуществления АД включает аминокислотные остатки SEQ ID NO: 37. В других вариантах осуществления АД включает 5-25, 5-50, 5-75, 5-100, 5-125 или 5-150 аминокислотных остатков, больше 150 аминокислотных остатков или все аминокислотные остатки SEQ ID NO: 39. В других вариантах осуществления АД включает аминокислотные остатки SEQ ID NO: 39. В других вариантах осуществления АД включает аминокислотные остатки SEQ ID NO: 37-43 или 44.

[0094] В некоторых вариантах осуществления АД (например, в Адаптере и/или на клетке-мишени) связывается химерным антигенным рецептором (CAR). В некоторых вариантах осуществления АД связывается клеткой, экспрессирующей химерный антигенный рецептор. В некоторых вариантах осуществления АД (например, на клетке-мишени) связывается Адаптером. В некоторых вариантах осуществления АД связывается

scFv. В некоторых вариантах осуществления AD связывается связывающим доменом с альтернативным каркасом (ASBD). В некоторых вариантах осуществления AD связывается D-доменом. В некоторых вариантах осуществления AD связывается антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

[0095] AD, подходящие для применения в DDpp (например, Адаптере и CAR), раскрытом в настоящем изобретении, были раскрыты в публ. междунар. заявок WO 2016164305, WO 2016164308A1, WO 2019099440 и WO 2019099433, патентах США 10,662,248 и 10,647,775, и заявках на патент США 20200223934 и 20210002381, которые включены в настоящее описание посредством отсылки во всех отношениях.

В. Домены, связывающие антигенные детерминанты (ADBBD)

[0096] Белковый домен, который связывается с антигенной детерминантой (AD), в настоящем изобретении указан как "домен, связывающий антигенную детерминанту" или "ADBBD". В некоторых вариантах осуществления ADBBD является достаточным для обеспечения распознавания и специфичного связывания с мишенью, представляющей интерес. ADBBD, описанный в настоящем изобретении, может присутствовать в слитом белке DDpp, Адаптере и/или химерном антигенном рецепторе (CAR)).

[0097] В некоторых вариантах осуществления ADBBD (например, слитого белка DDpp, Адаптера и/или CAR) является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления ADBBD представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления ADBBD является связывающим доменом с альтернативным каркасом. В некоторых вариантах осуществления ADBBD является D-доменом.

[0098] Домены ADBBD, подходящие для применения в DDpp (например, Адаптере и CAR), раскрытом в настоящем изобретении, были раскрыты в публ. междунар. заявок WO 2016164305, WO 2016164308A1, WO 2019099440 и WO 2019099433, патентах США 10,662,248 и 10,647,775, и заявках на патент США 20200223934 и 20210002381, которые включены в настоящее описание путем ссылки во всех отношениях.

i. Полученные из антител домены, связывающие антигенные детерминанты (ADBBD)

[0100] В некоторых вариантах осуществления один или более ADBBD (например, слитого белка DDpp, Адаптера и/или CAR) могут быть получены из молекулы антитела, например, одного или более моноклональных антител, поликлональных антител, рекомбинантных антител, человеческих антител, гуманизированных антител, однодоменных антител, например, переменного домена тяжелой цепи (VH), переменного домена легкой цепи (VL) и переменного домена (VHH), например, человеческого или верблюжьего происхождения. В некоторых вариантах осуществления ADBBD получен из того же биологического вида, у которого Адаптер или CAR будут в итоге использоваться, например, для применения у человека. Может быть полезным, чтобы Адаптер и/или CAR включали человеческий или гуманизированный ADBBD. Композиции и методы создания таких доменов ADBBD известны в уровне техники.

[0101] В некоторых вариантах осуществления ADBBD (например, слитого белка

DDpp, Адаптера и/или CAR) включает фрагмент антитела, который является достаточным для обеспечения распознавания и специфичного связывания с антигеном-мишенью. Примеры фрагмента антитела включают, без ограничения, Fab, Fab', F(ab')₂ или Fv-фрагмент, scFv фрагмент антитела, линейное антитело, однодоменное антитело, такое как sdAb (VL или VH), домен VHH верблюдового и мультиспецифичные антитела, сформированные из фрагментов антител.

[0102] В некоторых вариантах осуществления ADBD (например, слитого белка DDpp, Адаптера и/или CAR) представляет собой "scFv", который может включать слитый белок, включающий VL цепь и VH цепь антитела, где VH и VL, например, соединены через короткий гибкий полипептидный линкер, например, линкер, описанный в настоящем изобретении. Фрагменты scFv могут быть обычно получены согласно способам, известным в уровне техники (см., например, Bird et al., Science 242: 423-426 (1988) и Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 (1988)).

[0103] В некоторых вариантах осуществления ADBD (например, слитого белка DDpp, Адаптера и/или CAR) представляет собой однодоменную антигенсвязывающую молекулу (SDAB). Молекула SDAB включает молекулы, содержащие определяющие комплементарность области, которые являются частью однодоменного полипептида. Примеры включают, без ограничения, переменные домены тяжелой цепи, связывающие молекулы, которые в своей естественной форме не имеют легких цепей, одиночные домены, полученные из обычных 4-цепочечных антител, сконструированные домены и однодоменные каркасы, отличающиеся от каркасов, полученных из антител. Молекулы SDAB могут быть получены из любых биологических видов, в том числе, без ограничения, мыши, человека, верблюда, ламы, рыбы, акулы, козы, кролика и бычьего. Данный термин также включает природные молекулы однодоменных антител из других биологических видов кроме Верблюдовых и акул.

[0104] В некоторых вариантах осуществления ADBD (например, слитого белка DDpp, Адаптера и/или CAR) включает человеческое антитело или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ADBD (например, слитого белка DDpp, Адаптера и/или CAR) включает гуманизированное антитело или его фрагмент.

[0105] Гуманизация антител известна в уровне техники и может быть по существу выполнена согласно методу Уинтера и сотрудников (Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323-327 (1988); Verhoeven et al., Science 239: 1534-1536 (1988)), путем замены соответствующих последовательностей человеческого антитела CDR-областями или CDR-последовательностями грызунов, т.е. CDR-графтинга (EP 239,400; публ. междунар. заявки WO 91/09967; и пат. США 4,816,567; 6,331,415; 5,225,539; 5,530,101; 5,585,089 и 6,548,640; содержание которых полностью включено в настоящее описание путем ссылки). Гуманизация антител может быть также выполнена путем винирования или изменения поверхностных остатков (EP 592,106; EP 519,596; Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5): 489-498; Studnicka et al., Protein Engineering 7(6): 805-814 (1994); и Roguska et al., PNAS 91: 969-973 (1994)) или перетасовки цепей (пат. США

5,565,332), содержание которых полностью включено в настоящее описание путем ссылки.

ii. Связывающие домены с альтернативными каркасами

[0106] В некоторых вариантах осуществления ADBD (s) (например, слитого белка DDpp, Адаптера и/или CAR) представляет собой связывающий домен с альтернативным каркасом (ASBD). "Связывающий домен с альтернативным каркасом" или "ASBD" при использовании в настоящем изобретении представляет собой домен, связывающий антигенную детерминанту, который получен из или соответствует связывающему каркасу не на основе антител.

[0107] В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен CAR, включающий ADBD, который представляет собой ASBD. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена клетка, включающая CAR, включающий ADBD, который представляет собой ASBD. В других вариантах осуществления предложена иммунная эффекторная клетка, включающая CAR, включающий ASBD. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен Адаптер, включающий ADBD, который представляет собой ASBD.

[0108] В других вариантах осуществления изобретения предложена композиция, включающая Адаптер и CAR, каждый из которых включает ASBD.

[0109] В некоторых вариантах осуществления связывание ASBD (например, слитого белка DDpp, Адаптера и/или CAR) с AD-мишенью опосредовано вторичными структурами связывающих каркасов, такими как альфа-спирали или бета-листы. В некоторых вариантах осуществления ASBD представляет собой связывающий домен на основе трехспирального пучка. В некоторых вариантах осуществления ASBD представляет собой связывающий домен на основе D-домена. В других вариантах осуществления ASBD представляет собой связывающий домен на основе Z-домена (Аффитела).

[0110] В некоторых вариантах осуществления ASBD (например, слитого белка DDpp, Адаптера и/или CAR) представляет собой AD-связывающий домен на основе D-домена (*de novo* связывающего домена). В некоторых вариантах осуществления D-домен включает последовательность, выбранную из группы: SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления D-домен включает последовательность, выбранную из группы: SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления D-домен включает последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления D-домен включает последовательность, выбранную из группы: SEQ ID NO: 74-93 и 94. В некоторых вариантах осуществления D-домен включает последовательность, выбранную из группы: SEQ ID NO: 70-73 и 92-94. В некоторых вариантах осуществления D-домен включает последовательность SEQ ID NO: 73.

[0111] В некоторых вариантах осуществления ASBD (например, слитого белка DDpp, Адаптера и/или CAR) представляет собой AD-связывающий домен на основе каркаса с Z-доменом (Аффитела). Связывающие домены на основе каркаса с Z-доменом обычно состоят из 58 аминокислотных остатков, в которых замены до 13 положений, расположенных в первой и второй из трех альфа-спиралей, обеспечивают связывание,

распознавание мишени (AD) и специфичность связывания с мишенью (AD), представляющей интерес. Связывающие домены на основе каркаса с Z-доменом (Аффитела) также описаны в патенте США 5,831,012, все содержание которого полностью включено в настоящее описание путем ссылки.

[0112] Дополнительные примеры доменов ASBD, которые демонстрируют опосредованное вторичной структурой связывание мишени, включают связывающие каркасы на основе дарпинов, аффилинов и повтора *armadillo*.

[0113] В некоторых вариантах осуществления ASBD (например, слитого белка DDpp, Адаптера и/или CAR) представляет собой AD-связывающий домен на основе дарпина.

[0114] В некоторых вариантах осуществления ASBD представляет собой AD-связывающий домен на основе аднектина. Связывающий домен на основе аднектина получен из десятого домена фибронектина типа III (10Fn3). Этот ADBD обычно представляет собой связывающий домен длиной 94 аминокислоты, имеющий укладку типа бета-сэндвич, содержащую семь цепей, которые соединены шестью петлями. Замены в трех поверхностных петлях на одной стороне домена аднектина образуют мишень (AD)-специфичные связывающие фрагменты.

[0115] В некоторых вариантах осуществления ASBD (например, слитого белка DDpp, Адаптера и/или CAR) представляет собой AD-связывающий домен на основе липокалина, аффилина или антикалина. Антикалиновый каркас демонстрирует консервативную структуру β -цилиндра, сформированную восемью антипараллельными β -цепями, и обычно состоит из 160-180 аминокислот. Лигандсвязывающий карман связывающего каркаса на основе антикалина состоит из четырех петель, каждая из которых содержит до 24 замен, которые совместно обеспечивают распознавание мишени (AD) и специфичность связывания.

[0116] В некоторых вариантах осуществления ASBD (например, слитого белка DDpp, Адаптера и/или CAR) представляет собой AD-связывающий домен на основе авимерного каркаса. Связывающие домены на основе авимерного каркаса получены из А-домена рецепторов клеточной поверхности и обычно имеют длину 35 аминокислот. Связывающие домены на основе авимерного каркаса дополнительно описаны в публ. заявок на патент США 20040175756, 20050053973, 20050048512 и 20060008844, все содержание которых полностью включено в настоящее описание путем ссылки.

[0117] В некоторых вариантах осуществления ASBD (например, слитого белка DDpp, Адаптера и/или CAR) представляет собой AD-связывающий домен на основе финомерного каркаса. Финомерный связывающий домен обычно имеет длину 60-75 аминокислот и состоит из пары антипараллельных бета-листов, соединенных двумя гибкими петлями. Замены/вставки в петлях обеспечивают распознавание AD-мишени и специфичность связывания.

[0118] В некоторых вариантах осуществления ASBD (например, слитого белка DDpp, Адаптера и/или CAR) представляет собой AD-связывающий домен на основе

Ноттинового каркаса. Связывающие домены на основе Ноттинового каркаса соответствуют белковой структуре из 30 аминокислот, состоящей из трех антипараллельных β -тяжей, соединенных петлями переменной длины и несколькими дисульфидными связями.

[0119] В некоторых вариантах осуществления ASBD (например, слитого белка DDpp, Адаптера и/или CAR) представляет собой AD-связывающий домен на основе домена Куница. Связывающие домены на основе домена Куница получены из активного мотива ингибиторов протеаз Куниц-типа и обычно имеют длину приблизительно 60 аминокислот. Гидрофобное ядро такого ADBD состоит из скрученного двухцепочечного антипараллельного β -листа и двух α -спиралей, стабилизированных тремя парами дисульфидных связей. Замены и вставки в трех петлях обеспечивают распознавание AD-мишени и специфичность связывания. Связывающие домены на основе каркасов Куница также описаны в публ. междунар. заявки WO 2004063337, все содержание которой полностью включено в настоящее описание путем ссылки.

[0120] В некоторых вариантах осуществления ASBD (например, слитого белка DDpp, Адаптера и/или CAR) представляет собой AD-связывающий домен на основе WW домена.

С. Линкеры

[0121] Линкеры представляют собой пептидные или другие химические связи, расположенные между двумя или более в иных отношениях независимыми функциональными доменами слитого белка DDpp, Адаптера или CAR.

[0122] Подходящие линкеры для функционального связывания DDpp и дополнительного компонента слитого белка DDpp или двух или более функциональных доменов Адаптера в одноцепочечной аминокислотной последовательности включают, без ограничения, полипептидные линкеры, такие как глициновые линкеры, сериновые линкеры, смешанные глицин/сериновые линкеры, богатые глицином и серином линкеры или линкеры, состоящие в основном из полярных полипептидных фрагментов.

[0123] В одном варианте осуществления линкер состоит из большинства аминокислот, выбранных из глицина, аланина, пролина, аспарагина, глутамина и лизина. В одном варианте осуществления один или более линкеров в слитом белке DDpp, Адаптере или CAR состоят из большинства аминокислот, выбранных из глицина, аланина, пролина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, треонина, глутамина и лизина. В одном варианте осуществления один или более линкеров в слитом белке DDpp, Адаптере или CAR состоят из одной или более аминокислот, выбранных из глицина, аланина, пролина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, треонина, глутамина и лизина. В другом варианте осуществления один или более линкеров в слитом белке DDpp, Адаптере или CAR состоят из большинства аминокислот, которые стерически не затруднены. В другом варианте осуществления линкер, в котором большинство аминокислот представляют собой глицин, серин и/или аланин. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер выбран из полиглицинов (таких как (Gly)₅ (SEQ ID NO: 45) и (Gly)₈ (SEQ ID NO: 46), поли-(Gly-Ala) и полиаланинов. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит последовательность

Gly-Gly-Gly-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 47). В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит последовательность Gly-Gly-Gly-Gly-Asp-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 48). В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит последовательность SEQ ID NO: 118 или 119.

[0124] В одном варианте осуществления слитый белок DDpp, Адаптер или CAR включает ADBD (например, D-домен) непосредственно присоединенный (т.е. без линкера) к другому компоненту слитого белка DDpp, Адаптера или CAR соответственно. В одном варианте осуществления слитый белок DDpp, Адаптер или CAR содержит по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 доменов ADBD (например, D-доменов), непосредственно присоединенных к другому домену слитого белка DDpp, Адаптера или CAR соответственно.

[0125] В другом варианте осуществления ADBD (например, D-домен) может быть функционально связан с другим компонентом слитого белка DDpp, Адаптера или CAR через линкер. Слитые белки DDpp, Адаптеры или CAR-рецепторы могут содержать один линкер, множество линкеров или не содержать линкеров. В одном варианте осуществления слитый белок DDpp, Адаптер или CAR включает ADBD (например, D-домен), функционально связанный с другим компонентом слитого белка DDpp, Адаптера или CAR соответственно через пептидный линкер. В одном варианте осуществления слитый белок DDpp, Адаптер или CAR содержит по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 доменов ADBD (например, D-доменов), функционально связанных с другим доменом слитого белка DDpp, Адаптера или CAR соответственно через одинаковые или разные линкеры.

[0126] Линкеры могут иметь любой размер или состав при условии, что они в способны функционально связывать функциональный домен слитого белка DDpp, Адаптера или CAR таким способом, который позволяет функциональному домену функционировать (например, способность домена, связывающего антигенную детерминанту, связывать представляющую интерес мишень). В некоторых вариантах осуществления линкер(ы) содержат от приблизительно 1 до приблизительно 100 аминокислот, приблизительно 1-50 аминокислот, приблизительно 1-20 аминокислот, приблизительно 1-15 аминокислот, приблизительно 1-10 аминокислот, приблизительно 1-5 аминокислот, приблизительно 2-20 аминокислот, приблизительно 2-15 аминокислот, приблизительно 2-10 аминокислот или приблизительно 2-5 аминокислот. Следует понимать, что длина, степень гибкости и/или другие свойства линкера(ов) могут оказывать некоторое влияние на свойства конечного полипептида согласно изобретению, в том числе, без ограничения, аффинность, специфичность или авидность по отношению к представляющей интерес мишени или одному или больше другим представляющим интерес белкам-мишеням. Когда в слитом белке DDpp, Адаптере или CAR используются два или более линкеров, эти линкеры могут быть одинаковыми или разными. В контексте изобретения, представленного в настоящем изобретении, специалист в данной области сумеет стандартным методом определить оптимальный состав и длину линкера для

функционального связывания функциональных доменов слитого белка DDpp, Адаптера или CAR.

[0127] Линкер может быть также непептидным линкером, таким как алкильный линкер или ПЭГ линкер. Например, алкильные линкеры, такие как $-NH-(CH_2)_s-C(0)-$, где может использоваться $s=2-20$. Такие алкильные линкеры могут быть дополнительно замещены любой не создающей стерических затруднений группой, такой как низший алкил, например, C1-C6 низший ацил, галоген (например, Cl, Br), CN, NH₂, фенил и т.д. Примером непептидного линкера является ПЭГ линкер. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ линкер имеет молекулярную массу приблизительно 100-5000 кДа или приблизительно 100-500 кДа.

[0128] Подходящие линкеры для соединения функциональных доменов слитого белка DDpp, Адаптера или CAR путем химического сшивания включают, без ограничения, гомобифункциональные химические сшивающие соединения, такие как глутаровый альдегид, имидоэфиры, такие как диметиладипимидат (DMA), диметилсуберимидат (DMS) и сложные эфиры диметилпимелимидата (DMP) или N-гидроксисукцинимидата (NHS), такие как дитиобис(сукцинимидилпропионат) (DSP) и дитиобис(сульфосукцинимидилпропионат) (DTSSP). Примеры подходящих линкеров для соединения функциональных доменов слитого белка DDpp, Адаптера или CAR включают, без ограничения, сшивающие агенты с одним амино-реактивным концом и сульфгидрил-реактивной группой на другом конце или с NHS сложным эфиром на одном конце и SH-реактивной группой (например, малеимидной или пиридилной).

[0129] В дополнительных вариантах осуществления один или более линкеров в слитом белке DDpp, Адаптере или CAR являются расщепляемыми. Примеры расщепляемых линкеров включают, без ограничения, пептидную последовательность, распознаваемую протеазами (*in vitro* или *in vivo*) различных типов, такими как Tев, тромбин, фактор Ха, плазмин (протеазы крови), металлопротеазы, катепсины (например, GFLG и др.), а также протеазы, обнаруженные в других областях тела.

[0130] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой "расщепляемый линкер", который облегчает высвобождение функционального домена слитого белка DDpp, функционального домена Адаптера или цитотоксического средства в клетке или на клеточной поверхности. Например, кислотолабильный линкер (например, гидразон), протеаза-чувствительный (например, пептидаза-чувствительный) линкер, фотоллабильный линкер, диметилловый линкер или дисульфидсодержащий линкер (см., например, Chari, Can. Res. 52: 127 131 (1992); патент США 5,208,020 и заявку на патент США 20090110753; содержание которых полностью включено в настоящее описание путем ссылки) могут использоваться, когда требуется, чтобы ковалентная связь между DDpp или цитотоксическим средством и партнером по слиянию расщеплялась внутриклеточно при интернализации композиции в клетку. Термины "внутриклеточно расщепляемый" и "внутриклеточное расщепление" относятся к метаболическому процессу или реакции внутри клетки с участием конъюгата лекарственного средства DDpp, при которых

ковалентное прикрепление, т.е. связь через линкер между DDpp и цитотоксическим средством, DDpp и партнером по слиянию или между двумя DDpp расщепляется, в результате чего свободный DDpp и/или цитотоксическое средство диссоциируют внутри клетки.

[0131] В дополнительных вариантах осуществления один или более линкеров в CAR являются расщепляемыми. Примеры расщепляемых линкеров включают, без ограничения, пептидную последовательность, распознаваемую протеазами (*in vitro* или *in vivo*) различного типа, такими как Tев, тромбин, фактор Ха, плазмин (протеазы крови), металлопротеазы, катепсины (например, GFLG и др.), а также протеазами, присутствующими в других областях тела.

[0132] В некоторых вариантах осуществления короткий олиго- или полипептидный линкер длиной приблизительно 1-100 аминокислот используется для соединения любых доменов CAR. Линкеры могут состоять из гибких остатков, таких как глицин и серин (или любая другая аминокислота), чтобы смежные белковые домены могли свободно перемещаться относительно друг друга. Состав аминокислотной последовательности линкера может быть подобран так, чтобы свести к минимуму потенциальную иммуногенность CAR. Более длинные линкеры могут использоваться, если нужно гарантировать, чтобы два соседних домена не создавали стерических препятствий друг для друга.

[0133] В некоторых вариантах осуществления между трансмембранным доменом и цитоплазматическим сигнальным доменом CAR предпочтительно образуется связь длиной от 2 до 10 аминокислот. В дополнительных вариантах осуществления линкер имеет длину от 10 до 15 аминокислот или от 15 до 20, или от 20 до 30, или от 30 до 60, или от 60 до 100 аминокислот (или в любом диапазоне между перечисленными значениями). В дополнительных вариантах осуществления линкер представляет собой глицин-сериновую дублетную последовательность. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный спейсерный домен (ESD) соответствует области ESD альфа-цепи поверхностного гликопротеина CD8 Т-клеток человека (например, аминокислотные остатки 138-182 альфа-цепи CD8; Swiss-Prot Acc. No. P01732). В некоторых вариантах осуществления ESD соответствует ESD-области CD8, которая была дополнительно модифицирована путем аминокислотной замены для улучшения экспрессионной функции или иммуногенности. В дополнительных вариантах осуществления ESD соответствует ESD CD28 или последовательностям, содержащим модификации ESD CD28, которые обеспечивают улучшенную экспрессионную функцию или иммуногенность.

[0134] Оптимизацию линкера можно оценивать с использованием методик, описанных в настоящем изобретении и/или иным образом известных из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления линкеры не нарушают способность слитого белка DDpp, Адаптера или CAR связывать антигенную детерминанту-мишень и/или способность функционировать другого функционального домена Адаптера или CAR соответствующим образом (например, способность эффекторного функционального домена в Адаптере для

активации эффекторной функции или способности связывающего домена FcRn в Адаптере связывать FcRn).

D-доменсодержащие полипептиды (DDpp)

[0135] Согласно различным вариантам осуществления изобретение относится к DDpp, который специфично связывается с CD123. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает D-домен (DD), который специфично связывает CD123 и включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8-32 или 33. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. Изобретение также относится к белкам, включающим варианты D-доменов, которые сохраняют способность специфично связывать свои соответствующие мишени.

[0136] В некоторых вариантах осуществления DDpp включает D-домен (DD), который специфично связывает p26 АФП и включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74-93 или 94. Изобретение также относится к белкам, включающим варианты D-доменов, которые сохраняют способность специфично связывать свои соответствующие мишени.

[0137] В некоторых вариантах осуществления DDpp слит с гетерологичным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный полипептид включает полноразмерное антитело или фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления DD слит с: N-концом тяжелой цепи полноразмерного антитела; N-концом легкой цепи полноразмерного антитела; C-концом тяжелой цепи полноразмерного антитела; или C-концом легкой цепи полноразмерного антитела. В других вариантах осуществления DD слит с фрагментом антитела, который представляет собой Fc. В дополнительных вариантах осуществления гетерологичный полипептид включает участника, выбранного из группы, состоящей из: (i) трансмембранного домена; (ii) мембраносвязанного домена; (iii) человеческого сывороточного альбумина или его фрагмента; (iv) АФП или его фрагмента; (v) p26 АФП или его фрагмента; (vi) внеклеточного домена рецептора или его фрагмента; и (vii) внеклеточного домена внутриклеточного рецептора (например, ядерного белка) или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления белок содержит гетерологичный полипептид, включающий внеклеточный домен или фрагмент внеклеточного домена ВСМА (SEQ ID NO: 34) или CD123 (SEQ ID NO: 1), или CD19 (SEQ ID NO: 95), или CS1 (SEQ ID NO: 35). В некоторых вариантах осуществления белок содержит гетерологичный полипептид, включающий внеклеточный домен или фрагмент внеклеточного домена рецептора, выбранного из группы, состоящей из: CD19, CD20, CD22, HVEM, BTLA, DR3, CD37; TSLPR, IL7R и gp96. В некоторых вариантах осуществления белок содержит гетерологичный полипептид, включающий антигенную часть сывороточного белка (например, АФП и p26 АФП). В некоторых вариантах осуществления белок содержит гетерологичный полипептид, включающий

антигенную часть внутриклеточного белка (например, ядерного белка). В некоторых вариантах осуществления белок является меченым. В других вариантах осуществления метка выбрана из группы, состоящей из ферментной метки, флуоресцентной метки, люминесцентной метки, биолюминесцентной метки и молекулы биотина. В дополнительных вариантах осуществления белок конъюгирован с терапевтическим или цитотоксическим средством. В некоторых вариантах осуществления белок содержит гетерологичный полипептид, который связывается с одним или больше комплексами главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I или класса II.

[0138] В некоторых вариантах осуществления DD DDpp является вариантом CD123-связывающей референсной последовательности DD, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100, который сохраняет способность специфично связывать CD123. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта DD включает аминокислотную последовательность варианта, который обладает по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 87%, 89%, 90%, 92%, 94%, 96% или 98% идентичностью последовательности с референсной последовательностью DD, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100, при этом вариант DD сохраняет способность специфично связывать CD123.

[0139] В некоторых вариантах осуществления DD в DDpp является вариантом p26 АФП-связывающей референсной последовательности DD, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94, который сохраняет способность специфично связывать p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта DD включает аминокислотную последовательность варианта, который обладает по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 87%, 89%, 90%, 92%, 94%, 96% или 98% идентичностью последовательности с референсной последовательностью DD, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94, при этом вариант DD сохраняет способность специфично связывать p26 АФП.

[0140] В конкретных вариантах осуществления идентичность между (запрашиваемой) последовательностью варианта DD и референсной последовательностью DD, также называемая глобальным выравниванием последовательностей, определяют с использованием компьютерной программы FASTDB, основанной на алгоритме Brutlag et al. *Comp. App. Biosci.* 6: 237-245 (1990). Предпочтительные параметры, используемые при выравнивании аминокислот FASTDB являются следующими: Матрица=РАМ 0, k-разрядность слова=2, Штраф за несоответствие=1, Штраф за продолжение=20, Длина группы рандомизации=0, Пороговый балл=1, Длина окна=длина последовательности, Штраф за пропуск=5, Штраф за размер пропуска=0,05, Размер окна=500 или длина рассматриваемой аминокислотной последовательности, в зависимости от того, что короче. Согласно этому варианту осуществления, если референсная последовательность DD короче, чем запрашиваемая вариантная последовательность DD из-за N- или C-концевых делеций, но не из-за внутренних делеций, исправление результатов проводят вручную, чтобы учесть то, что программа FASTDB не учитывает N- и C-концевые усечения референсной последовательности DD при вычислении глобального процента

идентичности. Для референсных последовательностей, усеченных на N- и C-концах по сравнению с запрашиваемой последовательностью, процент идентичности корректируют путем вычисления количества остатков запрашиваемой последовательности, которые являются N- и C-концевыми относительно референсной последовательности, которые не совпадают/выравниваются с соответствующим рассматриваемым остатком, в процентах от общего количества оснований в запрашиваемой последовательности. Определение того, совпадает/выравнивается ли остаток, производят по результатам выравнивания последовательности FASTDB. Затем этот процент вычитают из процента идентичности, вычисленного с помощью указанной выше программы FASTDB с использованием указанных параметров, получая окончательное значение процента идентичности. Это окончательное значение процента идентичности используют в рамках данного варианта осуществления.

[0141] В некоторых вариантах осуществления раскрытый DDpp (например, слитый белок DDpp) является меченым. Метки, которые могут использоваться для мечения DDpp, включают, без ограничения, ферментную метку, флуоресцентную метку, люминесцентную метку и биолюминесцентную метку. В некоторых вариантах осуществления меткой является молекула биотина. В некоторых вариантах осуществления меткой является молекула стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления метка представляет собой His-метку или FLAG-метку. В некоторых вариантах осуществления меткой является люцифераза, зеленый флуоресцентный белок, красный флуоресцентный белок или другое подобное средство. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает CD123-связывающий DD, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает DD, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает DD, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает p26-связывающий DD, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94.

[0142] В других вариантах осуществления слитый белок DDpp прикреплен к твердой подложке. В некоторых вариантах осуществления твердая подложка выбрана из группы, состоящей из: гранулы, предметного стекла, чипа, желатина и агарозы. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает CD123-связывающий DD, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает DD, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает DD, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает p26-связывающий DD, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94.

[0143] В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, слитый белок DDpp) ассоциирован с липосомой. В некоторых вариантах осуществления DDpp ассоциирован с липосомой посредством ковалентного связывания. В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок. В дополнительных вариантах осуществления DDpp представляет собой CAR. В дополнительных вариантах осуществления DDpp ассоциирован с липосомой посредством ионного связывания, а не ковалентного связывания. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает CD123-связывающий DD, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает DD, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает DD, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает р26-связывающий DD, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94.

[0144] В некоторых вариантах осуществления DDpp, связывающий мишень, конъюгирован с терапевтическим или цитотоксическим средством (например, химиотерапевтическим средством или радиотерапевтическим средством). В некоторых вариантах осуществления DDpp включает CD123-связывающий DD, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает DD, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает DD, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает р26-связывающий DD, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94.

Таблица 1 - Примеры мишеньспецифических связывающих DD

SEQ ID NO:	Последовательность D-домена	Мишень
4	MGSWDEFGRRLYAIEWRLYALGGSEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGKGNPEVEKLRREIAAVIRSNLQAYRHN	CD123
5	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGKGNPEVEKLRREIAAVIRENLQAYRHN	CD123
6	MGSWDEFGRRLYAIEWRLYALGGSEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGKGSPEVEKLRREIAAVIRSNLQAYRHN	CD123
7	MGSWDEFSRRLYAIEWRLYALGGSEAELAAFEKEIAAFESL QAYKGKGNPEVEKLRREIAAVIRSNLQAYRHN	CD123
8	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGKGSPEVEKLRREIAAVIRENLQAYRHN	CD123
9	MGSWDEFSRRLYAIEWQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGKGNPEVEKLRREIAAVIRENLQAYRHN	CD123
10	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGKGNPEVEKLRREIAAVIRENLQAYRHN	CD123
11	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFESE	CD123

SEQ ID NO:	Последовательность D-домена	Мишень
	LQAYKGEKSPEVEKLREIAAVIRENLQAYRHN	
12	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYAQGGTEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKNPEVEKLRELA AVIRENLQAYRHN	CD123
13	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGEKSPEVEKLRELA AVIRENLQAYRHN	CD123
14	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYAQGGTEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGEKSPEVEKLRELA AVIRENLQAYRHN	CD123
15	MGSWSEFGRRLYAIEWQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKNPEVEKLREIAAVIRENLQAYRHN	CD123
16	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKNPEVEKLREIAAVIRDELQAYRHN	CD123
17	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKNPEVEKLREIAAVIREELQAYRHN	CD123
18	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKNPEVEKLREIAAVIRDNLQAYRHN	CD123
19	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKNPEVEKLREIAAAIRENLQAYRHN	CD123
20	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKNPEVEKLREEAAVIRENLQAYRHN	CD123
21	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKNPEVEKLREIAAVIRENLQAYRHN	CD123
22	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKNPEVEALREIAAVIRENLQAYRHN	CD123
23	MGSWDEFGRRLYAIEWQLEALGGTEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKNPEVEKLREIAAVIRENLQAYRHN	CD123
24	MGSWDEFGRRLYA IETQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFESL QAYKGGKNPEVEKLREIAAVIRENLQAYRHN	CD123
25	MGSWDEFGRRLYAIKWQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKNPEVEKLREIAAVIRENLQAYRHN	CD123
26	MGSWDEFGRRLAAIEWQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKNPEVEKLREIAAVIRENLQAYRHN	CD123
27	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKNPEVEKLREIAAVIRENLQAYRHN	CD123
28	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKNPEVEKLREIAAVIRENLQAYRHN	CD123
29	MGSWAEFGRRLYAIEWQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKNPEVEKLREIAAVIRENLQAYRHN	CD123
30	MGSWDEFGRRLYAIEWRLYALGGSEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGIGNPEVENLREIAAVIRSNLQAYRHN	CD123
31	MGSWDEFGRRLYAIESQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFESL QAYKGGKNPEVEKLREIAAVIRENLQAYRHN	CD123
32	MGSWDEFGRRLYAIEAQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFESL QAYKGGKNPEVEKLREIAAVIRENLQAYRHN	CD123
33	MGSWDEFGRRLYAIEEQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFESL QAYKGGKNPEVEKLREIAAVIRENLQAYRHN	CD123
97	MGSWSEFNMRDLAIYERLTALGGSEAELAAFEKEIAAFESL QAYKGGKNPEVEWLRHSAARIRLELQAYRHN	CD123
98	MGSWIEFNMRDLAIYERLV ALGGSEAELAAFEKEIAAFESL QAYKGGKNPEVEWLRKVAANIRLELQAYRHN	CD123
99	MGSWDEFGRRLYAIEWRLYALGGSEAELAAFEKEIAAFESE	CD123

SEQ ID NO:	Последовательность D-домена	Мишень
	LQAYKGGKGNPEVEKLRVHAAVIRSNLQAYRHN	
100	MGSWDEFGRRLYAIEWRLYALGGSEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKGNPEVEKLRVHAAVIRSNLQAYRHN	CD123
111	MGSWEEFDKRLDAITRRLMALGGSEAELAEFESTIAWFWD LQAYKGGKGNPEVEALDWEAYAIDYELGAYRHN	CD123
70	MGSWFEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKGNPEVESLRVHAAAIREWQLQAYRHN	p26 АФП
71	MGSWFEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKGNPEVESLREHAAHIREWLQAYRHN	p26 АФП
72	MGSWFEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKGNPEVESLREHAAAIREWQLQAYRHN	p26 АФП
73	MGSWSEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKGNPEVESLREHAAAIREWQLQAYRHN	p26 АФП
74	MGSWYEFYTRLDAIDARLWALGGSEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKGNPEVEKLRVHAAAIRNWLQAYRHN	p26 АФП
75	MGSWLEFWNRLEAIDQRLWALGGSEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKGNPEVEVLREHAAAIRAWLQAYRHN	p26 АФП
76	MGSWVEFWNRLQAIDTRLWALGGSEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKGNPEVESLRIHAAHIRFWLQAYRHN	p26 АФП
77	MGSWHEFWRLDAIDTRLWALGGSEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKGNPEVESLREHAAAIRYWLQAYRHN	p26 АФП
78	MGSWIEFYVRLDAIDTRLWALGGSEAELAAFEKEIAAFESL QAYKGGKGNPEVESLREHAAAYIRVWLQAYRHN	p26 АФП
79	MGSWMEFMTRLDAIDERLWALGGSEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKGNPEVESLREHAAAIRHWLQAYRHN	p26 АФП
80	MGSWTEFDRLQAIDNRLWALGGSEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKGNPEVEALREQAASIRIWLQAYRHN	p26 АФП
81	MGSWVEFYHRLEAIENRLFALGGSEAELAAFEKEIAAFESL QAYKGGKGNPEVENLRQHAAHIRQWLQAYRHN	p26 АФП
82	MGSWMEFSDRLF AIWIRLWALGGSEAELAAFEKEIAAFESL QAYKGGKGNPEVEGLRSLAAHIRGHLQAYRHN	p26 АФП
83	MGSWTEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKGNPEVESLRVHAAAIREWQLQAYRHN	p26 АФП
84	MGSWTEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKGNPEVESLRAHAAAIREWQLQAYRHN	p26 АФП
85	MGSWTEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKGNPEVESLKAHAAAIREWQLQAYRHN	p26 АФП
86	MGSWTEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKGNPEVESLQAHAAAIREWQLQAYRHN	p26 АФП
87	MGSWTEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKGNPEVESLRAHAAAGIREWLQAYRHN	p26 АФП
88	MGSWSEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKGNPEVESLRSHAAAIREWQLQAYRHN	p26 АФП
89	MGSWSEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKGNPEVESLQSHAAAIREWQLQAYRHN	p26 АФП
90	MGSWTEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKGNPEVESLRSHAAAIREWQLQAYRHN	p26 АФП
91	MGSWTEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKGNPEVESLQSHAAAIREWQLQAYRHN	p26 АФП
92	MGSWTEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELAAFEKEIAAFESE	p26 АФП

SEQ ID NO:	Последовательность D-домена	Мишень
	LQAYKGGKGNPEVESLREHAAHIREWLQAYRHN	
93	MGSWSEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKGNPEVESLREHAAHIREWLQAYRHN	p26 АФП
94	MGSWTEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKGNPEVESLREHAAAIREWLQAYRHN	p26 АФП

[0145] В некоторых вариантах осуществления изобретения предложены композиции, включающие одну или более последовательностей DD, раскрытых в Таблице 1. В других вариантах осуществления изобретение относится к композициям, включающим один или более DD доменов, включающих последовательность с 60-70%, 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 95-99% гомологией (и перекрыванием указанных диапазонов) с последовательностью, раскрытой в Таблице 1. В некоторых вариантах осуществления DD домены, имеющие такую гомологию, функционально подобны или идентичны при сравнении с соответствующей референсной последовательностью в Таблице 1. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к полипептиду, включающему один или более DD, конкурирующих (полностью или частично) с одной или более последовательностями DD, раскрытыми в Таблице 1 (референсная последовательность), за свою соответствующую мишень. Способность одного полипептида конкурировать с референсным полипептидом за связывание с соответствующей мишенью обычно можно определить с помощью стандартного конкурентного анализа, известного в уровне техники. В некоторых вариантах осуществления конкуренция не требует, чтобы полипептид конкурировал за тот же эпитоп, что и полипептид (DD) из Таблицы 1, скорее полипептид может конкурировать путем связывания стерически ингибирующего эпитопа, перекрывающегося эпитопа *и т.д.*

D. CD123-связывающий DDpp

[0146] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к белку, включающему мишень-связывающий домен (DDpp) D-домена (DD), который специфично связывает CD123 (SEQ ID NO: 1) и включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8-32 или 33. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает DD, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает DD, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

[0147] В некоторых вариантах осуществления DD в DDpp специфично связывает CD123. В других вариантах осуществления DD специфично связывает CD123, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В других вариантах осуществления DDpp включает вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления DDpp специфично связывает CD123 (SEQ ID NO: 1) и включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 или 33. В некоторых

вариантах осуществления DDpp включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. в некоторых вариантах осуществления DDpp включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33.

[0148] В других вариантах осуществления CD123-связывающий DDpp включает вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-32 и 33. В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий DDpp включает множество мишень-связывающих доменов, связывающих одну мишень (например, димеры, тримеры и т.д.). В некоторых вариантах осуществления DDpp включает 2, 3, 4, 5 или больше 5 DD, которые специфично связывают CD123 и которые имеют аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает 2, 3, 4, 5 или больше 5 DD, которые имеют одинаковую последовательность. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает 2, 3, 4, 5 или больше 5 DD, которые специфично связываются с разными эпитопами CD123 и которые имеют аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает DD, который специфично связывает CD123, и дополнительно включает 2, 3, 4, 5 или больше 5 дополнительных других DD или мишень-связывающих доменов (например, scFv), которые специфично связываются с CD123 или другим антигеном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает DD, который специфично связывает CD123 (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100), и дополнительно включает один или более дополнительных DD или другие мишень-связывающие домены, которые связывают один или более антигенов, экспрессируемых на поверхности В-клетки. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает DD, который специфично связывает CD123, например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100), и дополнительно включает один или более дополнительных DD или другие мишень-связывающие домены, которые связывают один или более раковых антигенов. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает DD, который специфично связывает CD123 (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100), и специфично связывает 2, 3, 4, 5 или больше 5 разных мишеней. В других вариантах осуществления DDpp включает DD, который специфично связывает CD123 (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100), и специфично связывает 2, 3, 4, 5 или больше 5 разных раковых антигенов. В некоторых

вариантах осуществления DDpp включает DD, который специфично связывает CD123 (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100) и специфично связывает 2, 3, 4, 5 или больше 5 разных раковых антигенов, экспрессируемых на поверхности раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает DD, который специфично связывает CD123 (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100) и специфично связывает 2, 3, 4, 5 или больше 5 раковых антигенов, экспрессируемых на поверхности различных раковых клеток. В некоторых вариантах осуществления CD123-специфичный DD включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления CD123-специфичный DD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

[0149] В некоторых вариантах осуществления DDpp включает вариант CD123-связывающего DD, раскрытого в настоящем изобретении (референсного DD), который сохраняет способность специфично связывать CD123. В некоторых вариантах осуществления последовательность CD123-связывающего варианта DD содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных или неконсервативных замен по сравнению с референсным CD123-связывающим DD, имеющим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления последовательность CD123-связывающего варианта DD содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных замен по сравнению с референсным CD123-связывающим DD, имеющим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления последовательность CD123-связывающего варианта DD содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 неконсервативных замен по сравнению с референсным CD123-связывающим DD, имеющим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления референсный CD123-связывающий DD включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления референсный CD123-связывающий DD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

[0150] В некоторых вариантах осуществления последовательность CD123-связывающего варианта DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных или неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам 1-22, 29-46 и 52-72 референсного CD123-связывающего DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления последовательность CD123-связывающего варианта DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам 1-22, 29-46 и 52-72 референсного CD123-DD, имеющего аминокислотную

последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления последовательность CD123-связывающего варианта DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам 1-22, 29-46 и 52-72 референсного CD123-связывающего DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления референсный CD123-связывающий DD включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления референсный CD123-связывающий DD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

[0151] В некоторых вариантах осуществления последовательность CD123-связывающего варианта DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных или неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам: 2-6, 8-10, 12, 13, 15-17, 19, 20, 29, 30, 32-34, 36, 37, 39-41, 43, 44, 52-55, 57-59, 61, 62, 64-66 и 68-70 референсного CD123-связывающего DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления последовательность CD123-связывающего варианта DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам: 2-6, 8-10, 12, 13, 15-17, 19, 20, 29, 30, 32-34, 36, 37, 39-41, 43, 44, 52-55, 57-59, 61, 62, 64-66 и 68-70 референсного DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления последовательность CD123-связывающего варианта DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам: 2-6, 8-10, 12, 13, 15-17, 19, 20, 29, 30, 32-34, 36, 37, 39-41, 43, 44, 52-55, 57-59, 61, 62, 64-66 и 68-70 референсного DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления референсный CD123-связывающий DD включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления референсный CD123-связывающий DD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

[0152] В некоторых вариантах осуществления последовательность CD123-связывающего варианта DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных или неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам: 7, 11, 14, 18, 21, 28, 31, 35, 38, 42, 45, 53, 56, 60, 63 и 67 референсного CD123-связывающего DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления последовательность CD123-связывающего варианта DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных замен в

положениях, соответствующих аминокислотным остаткам: 7, 11, 14, 18, 21, 28, 31, 35, 38, 42, 45, 53, 56, 60, 63 и 67 референсного DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления последовательность CD123-связывающего варианта DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам: 7, 11, 14, 18, 21, 28, 31, 35, 38, 42, 45, 53, 56, 60, 63 и 67 референсного DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления референсный CD123-связывающий DD включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления референсный CD123-связывающий DD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

[0153] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к CD123-связывающему DDpp, который полностью или частично (например, перекрывается с эпитопом) блокирует связывание референсного DD с CD123, где референсный DD имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В других вариантах осуществления изобретение относится к CD123-связывающему DDpp, который связывается с тем же эпитопом CD123, что и референсный DD, состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления референсный CD123-связывающий DD включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления референсный CD123-связывающий DD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

[0154] В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок, включающий DD, который специфично связывает CD123. В некоторых вариантах осуществления DD в слитом белке DDpp специфично связывает CD123, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В других вариантах осуществления DDpp включает вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах

осуществления слитый белок DDpp включает полноразмерное антитело или часть (фрагмент) антитела. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp включает полноразмерное IgG антитело (например, IgG1, IgG2, IgG2 или IgG4). В других вариантах осуществления слитый белок DDpp включает полноразмерное антитело, которое специфично связывает раковый антиген. В других вариантах осуществления DDpp включает коммерчески одобренное терапевтическое антитело (например, ритуксимаб, офатумумаб, окрелизумаб, велтузумаб, MEDI-551, эпрутузумаб, белимумаб, табалумаб, AMG-557, MEDI-570 и NN882). В других вариантах осуществления CD123-связывающий DDpp является Fc-слитым белком.

[0155] В некоторых вариантах осуществления DDpp является слитым белком, включающим CD123-связывающий DD, функционально связанный с сывороточным белком. В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий слитый белок DDpp включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33. В других вариантах осуществления CD123-связывающий слитый белок DDpp включает вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий слитый белок DDpp включает весь или часть человеческого сывороточного альбумина. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp включает АФП (SEQ ID NO: 36), или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий слитый белок DDpp включает р26 АФП (SEQ ID NO: 37), или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий слитый белок DDpp включает полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 37-43 или 44. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент сывороточного белка или антигенный фрагмент сывороточного белка (например, АФП и р26 АФП). В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp включает фрагмент, состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислот сывороточного белка. В некоторых вариантах осуществления CD123-специфичный DD включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления CD123-специфичный DD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

[0156] В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий слитый белок DDpp включает внеклеточный домен рецептора или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp включает DD, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий DDpp включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий DDpp включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий DDpp включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий DDpp включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий DDpp включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий DDpp включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий DDpp включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33. В других вариантах осуществления CD123-связывающий слитый белок DDpp включает вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В других вариантах осуществления CD123-связывающий слитый белок DDpp включает внеклеточный домен CD123 (SEQ ID NO: 1) или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий слитый белок DDpp включает внеклеточный домен рецептора, выбранного из группы, состоящей из: CD19, CD20, CD22, HVEM, BTLA, DR3, CD37; TSLPR, IL7R, NKG2D и gp96, или его фрагмент.

[0157] В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий слитый белок DDpp содержит фрагмент, состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислот внеклеточного домена рецептора клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент внеклеточного домена BCMA (SEQ ID NO: 34). В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент внеклеточного домена CD123 (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент внеклеточного домена CS1 (SEQ ID NO: 35). В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит фрагмент внеклеточного домена рецептора, выбранного из группы, состоящей из: CD19, CD20, CD22, HVEM, BTLA, DR3, CD37; TSLPR, IL7R и gp96.

[0158] В дополнительных вариантах осуществления CD123-связывающий слитый белок DDpp включает внутриклеточный белок (например, ядерный белок) или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp включает DD, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий DDpp включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления CD123-

связывающий DDpp включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. в некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий DDpp включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий DDpp включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий DDpp включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий DDpp включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий DDpp включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33. В других вариантах осуществления CD123-связывающий слитый белок DDpp включает вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий слитый белок DDpp включает фрагмент, состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислотных остатков внутриклеточного белка (например, ядерного белка).

В. р26 АФП-связывающий DDpp

[0159] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к белку, включающему мишень-связывающий домен (DDpp) D-домена (DD), который специфично связывает р26 АФП (SEQ ID NO: 37) и включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74-93 или 94.

[0160] В некоторых вариантах осуществления DD в DDpp специфично связывает р26 АФП. В других вариантах осуществления DD в DDpp специфично связывает р26 АФП, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В дополнительных вариантах осуществления р26 АФП-связывающий DDpp включает вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 92, 93 и 94. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 70-73, 92, 93 и 94. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 73.

[0161] В других вариантах осуществления DDpp включает вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В других вариантах осуществления DD специфично связывает р26 АФП, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 37, но не связывает специфично АФП, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления р26 АФП-связывающий DDpp включает множество мишень-связывающих доменов, которые связывают одну мишень (например, димеры,

тримеры и т.д.). В некоторых вариантах осуществления DDpp включает 2, 3, 4, 5 или больше 5 DD, которые специфично связывают p26 АФП и которые имеют аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает 2, 3, 4, 5 или больше 5 DD, имеющих одинаковую последовательность. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает 2, 3, 4, 5 или больше 5 DD, которые специфично связываются с разными эпитопами p26 АФП и которые имеют аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает DD, который специфично связывает p26 АФП, и дополнительно включает 2, 3, 4, 5 или больше 5 дополнительных других DD или мишень-связывающих доменов (например, scFv), которые специфично связываются с p26 АФП или другим антигеном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает DD, который специфично связывает p26 АФП (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94), и дополнительно включает один или более дополнительных DD или других мишень-связывающих доменов, которые связывают один или более антигенов, экспрессируемых на поверхности В-клетки. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает DD, который специфично связывает p26 АФП, например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94), и дополнительно включает один или более дополнительных DD или других мишень-связывающих доменов, которые связывают один или более раковых антигенов. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает DD, который специфично связывает p26 АФП (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94), и специфично связывает 2, 3, 4, 5 или больше 5 разных мишеней. В других вариантах осуществления DDpp включает DD, который специфично связывает p26 АФП (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94), и специфично связывает 2, 3, 4, 5 или больше 5 разных раковых антигенов. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает DD, который специфично связывает p26 АФП (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94), и специфично связывает 2, 3, 4, 5 или больше 5 разных раковых антигенов, экспрессируемых на поверхности раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает DD, который специфично связывает p26 АФП (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94), и специфично связывает 2, 3, 4, 5 или больше 5 раковых антигенов, экспрессируемых на поверхности различных раковых клеток.

[0162] В некоторых вариантах осуществления DDpp включает вариант p26 АФП-связывающего DD, раскрытый в настоящем изобретении (референсный DD), который сохраняет способность специфично связывать p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления последовательности p26 АФП-связывающий вариант DD содержит 1, 2, 3,

4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных или неконсервативных замен по сравнению с референсным р26 АФП-связывающим DD, имеющим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В некоторых вариантах осуществления последовательности р26 АФП-связывающий вариант DD содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных замен по сравнению с референсным р26 АФП-связывающим DD, имеющим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В некоторых вариантах осуществления последовательности р26 АФП-связывающий вариант DD содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 неконсервативных замен по сравнению с референсным р26 АФП-связывающим DD, имеющим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94.

[0163] В некоторых вариантах осуществления последовательности р26 АФП-связывающий вариант DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных или неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам 1-22, 29-46 и 52-72 референсного р26 АФП-связывающего DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В некоторых вариантах осуществления последовательности р26 АФП-связывающий вариант DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам 1-22, 29-46 и 52-72 референсного р26 АФП-DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В некоторых вариантах осуществления последовательность р26 АФП-связывающего варианта DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам 1-22, 29-46 и 52-72 референсного р26 АФП-связывающего DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В некоторых вариантах осуществления референсный р26-связывающий DD включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 70-73 и 92-94. В некоторых вариантах осуществления референсный р26-связывающий DD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

[0164] В некоторых вариантах осуществления последовательности р26 АФП-связывающий вариант DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных или неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам: 2-6, 8-10, 12, 13, 15-17, 19, 20, 29, 30, 32-34, 36, 37, 39-41, 43, 44, 52-55, 57-59, 61, 62, 64-66 и 68-70 референсного р26 АФП-связывающего DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В некоторых вариантах осуществления последовательности р26 АФП-связывающий вариант DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам: 2-6, 8-10, 12, 13, 15-17, 19, 20, 29, 30, 32-34, 36, 37, 39-41, 43, 44, 52-55, 57-59, 61,

62, 64-66 и 68-70 референсного DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В некоторых вариантах осуществления последовательности р26 АФП-связывающий вариант DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам: 2-6, 8-10, 12, 13, 15-17, 19, 20, 29, 30, 32-34, 36, 37, 39-41, 43, 44, 52-55, 57-59, 61, 62, 64-66 и 68-70 референсного DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В некоторых вариантах осуществления референсный р26 АФП-связывающий DD включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 70-73 и 92-94. В некоторых вариантах осуществления референсный р26 АФП-связывающий DD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73.

[0165] В некоторых вариантах осуществления последовательности р26 АФП-связывающий вариант DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных или неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам: 7, 11, 14, 18, 21, 28, 31, 35, 38, 42, 45, 53, 56, 60, 63 и 67 референсного р26 АФП-связывающего DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В некоторых вариантах осуществления последовательности р26 АФП-связывающий вариант DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативные замены в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам: 7, 11, 14, 18, 21, 28, 31, 35, 38, 42, 45, 53, 56, 60, 63 и 67 референсного DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В некоторых вариантах осуществления последовательность р26 АФП-связывающего варианта DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам: 7, 11, 14, 18, 21, 28, 31, 35, 38, 42, 45, 53, 56, 60, 63 и 67 референсного DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В некоторых вариантах осуществления референсный р26 АФП-связывающий DD включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 70-73 и 92-94. В некоторых вариантах осуществления референсный р26 АФП-связывающий DD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73.

[0166] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к р26 АФП-связывающему DDpp, который полностью или частично (например, перекрывается с эпитопом) блокирует связывание референсного DD с р26 АФП, где референсный DD имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В других вариантах осуществления изобретение относится к р26 АФП-связывающему DDpp, который связывается с тем же эпитопом р26 АФП, что и референсный DD, состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В некоторых

вариантах осуществления референсный p26-связывающий DD включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 70-73 и 92-94. В некоторых вариантах осуществления референсный p26-связывающий DD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73.

[0167] В некоторых вариантах осуществления DDpp является слитым белком, включающим DD, который специфично связывает p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления DD специфично связывает p26 АФП, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В некоторых вариантах осуществления DD в слитом белке DDpp специфично связывает p26 АФП, но не связывает специфично АФП, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 36. В других вариантах осуществления DDpp включает вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В других вариантах осуществления p26 АФП-связывающий DDpp является Fc-слитым белком.

[0168] В некоторых вариантах осуществления DDpp является слитым белком, включающим DD, который специфично связывает p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления DDpp является слитым белком, включающим DD, который специфично связывает p26 АФП, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 37. В других вариантах осуществления DDpp включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В других вариантах осуществления DDpp является слитым белком, включающим p26 АФП-связывающий DD, который является вариантом DD, включающим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В некоторых вариантах осуществления DDpp является слитым белком, включающим DD, который специфично связывает p26 АФП, функционально связанный с полноразмерный антителом или частью (фрагментом) антитела. В некоторых вариантах осуществления DDpp является Fc-слитым белком. В некотором варианте осуществления слитый белок DDpp включает полноразмерное IgG антитело (например, IgG1, IgG2, IgG2 или IgG4). В других вариантах осуществления слитый белок DDpp включает полноразмерное антитело, которое специфично связывает раковый антиген. В других вариантах осуществления DDpp включает коммерчески одобренное терапевтическое антитело (например, ритуксимаб, офатумумаб, окрелизумаб, велтузумаб, MEDI-551, эпрутузумаб, белимумаб, табалумаб, AMG-557, MEDI-570, NN882, элотузумаб и даратумумаб). В других вариантах осуществления p26 АФП-связывающий DDpp является Fc-слитым белком. В других вариантах осуществления Fc-слитый белок включает вариантный Fc-домен человека.

[0169] В некоторых вариантах осуществления DDpp является слитым белком, включающим p26 АФП-связывающий DD, функционально связанный с сывороточным белком. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-

93 и 94. В других вариантах осуществления р26 АФП-связывающий слитый белок DDpp включает вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В других вариантах осуществления слитый белок DDpp включает человеческий сывороточный альбумин или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент сывороточного белка или антигенный фрагмент сывороточного белка. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp включает фрагмент, состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислот сывороточного белка.

[0170] В некоторых вариантах осуществления р26 АФП-связывающий слитый белок DDpp включает внеклеточный домен рецептора или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp включает DD, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В других вариантах осуществления р26 АФП-связывающий слитый белок DDpp включает вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В других вариантах осуществления р26 АФП-связывающий слитый белок DDpp включает внеклеточный домен ВСМА (SEQ ID NO: 34) или CD123 (SEQ ID NO: 1), или его фрагмент. В других вариантах осуществления р26 АФП-связывающий слитый белок DDpp включает внеклеточный домен ВСМА (SEQ ID NO: 34) или CD123 (SEQ ID NO: 1), или CS1 (SEQ ID NO: 35), или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления р26 АФП-связывающий слитый белок DDpp включает внеклеточный домен рецептора, выбранного из группы, состоящей из: CD19, CD20, CD22, HVEM, BTLA, DR3, CD37; TSLPR, IL7R и gp96, или его фрагмент.

[0171] В некоторых вариантах осуществления р26 АФП-связывающий слитый белок DDpp содержит фрагмент, состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислот внеклеточного домена рецептора клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент внеклеточного домена ВСМА (SEQ ID NO: 34) или CD123 (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент внеклеточного домена ВСМА (SEQ ID NO: 34) или CD123 (SEQ ID NO: 1), или CS1 (SEQ ID NO: 35). В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит фрагмент внеклеточного домена рецептора, выбранного из группы, состоящей из: CD19, CD20, CD22, HVEM, BTLA, DR3, CD37; TSLPR, IL7R и gp96.

[0172] В дополнительных вариантах осуществления р26 АФП-связывающий слитый белок DDpp включает внутриклеточный белок (например, ядерный белок) или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp включает DD, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В других вариантах осуществления р26 АФП-связывающий слитый белок DDpp включает вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В некоторых вариантах осуществления р26 АФП-связывающий слитый белок DDpp включает фрагмент, состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-

200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислотных остатков внутриклеточного белка (например, ядерного белка). В некоторых вариантах осуществления р26 АФП-связывающий слитый белок DDpp включает фрагмент сывороточного белка (например, HSA), внеклеточного домена рецептора (например, BCMA, CS1, CD123 и CD19) или внутриклеточного белка (например, ядерного белка), состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислотных остатков.

[0173] Изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим DDpp, и векторам, содержащим такие нуклеиновые кислоты. Изобретение также относится к клеткам-хозяевам, содержащим нуклеиновые кислоты, и к векторам, содержащим нуклеиновые кислоты (включая вирусные частицы). В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин является прокариотом или эукариотом, который экспонирует вариантный DD на своей поверхности. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин экспонирует вариантный DD на своей поверхности. В другом варианте осуществления клетка-хозяин является бактериофагом, который экспонирует вариантный DD на своей поверхности. В другом варианте осуществления клетка-хозяин является человеческой иммунной клеткой, которая экспрессирует вариантный слитый белок DD на своей поверхности.

[0174] Агонист DDpp относится к DDpp, который в некотором виде повышает или улучшает биологическую активность мишени DDpp (например, CD123) или обладает биологической активностью, сопоставимой с известным агонистом мишени DDpp. В другом варианте осуществления DDpp является антагонистом мишени, которую он связывает (например, CD123). Антагонист DDpp относится к DDpp, который полностью или частично блокирует или некоторым образом нарушает биологическую активность белка-мишени DDpp, или обладает биологической активностью, сопоставимой с известным антагонистом или ингибитором белка-мишени DDpp.

Слитые белки DDpp

[0175] Изобретение относится к слитым белкам DDpp. "Слитый белок", "химерный полипептид", "химерный белок", "химерный антиген" и DDpp, который включает/содержит гетерологичный полипептид, является полипептидом, состоящим по меньшей мере из двух полипептидов и, необязательно, линкера, для функционального связывания этих двух полипептидов в один непрерывный полипептид, получаемый, например, с помощью рекомбинантных процессов. Эти два полипептида могут быть функционально соединены непосредственно или опосредованно.

[0176] "Слитый белок DDpp", раскрытый в настоящем изобретении, включает по меньшей мере один DDpp, раскрытый в настоящем изобретении, который специфично связывает представляющую интерес мишень (например, BCMA (SEQ ID NO: 34), CD123 (SEQ ID NO: 1), CS1 (SEQ ID NO: 35), HER2, АФП (SEQ ID NO: 36), р26 АФП (SEQ ID NO: 37) или их фрагмент). В одном варианте осуществления слитый белок DDpp содержит один DDpp.

[0177] В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp является растворимым белком, включающим один или более мишень-связывающих DDpp и белок p26 (например, имеющий последовательность SEQ ID NO: 37-43 или 44). В некоторых вариантах осуществления растворимый слитый белок DDpp имеет полупериод существования в плазме *in vivo* по меньшей мере 1 час, по меньшей мере 2 часа, по меньшей мере 4 часа, по меньшей мере 8 часов, по меньшей мере 16 часов, по меньшей мере 32 часа, по меньшей мере 64 часа или больше. В некоторых вариантах осуществления растворимый слитый белок имеет полупериод существования в плазме *in vivo* по меньшей мере 1 час, по меньшей мере 2 часа, по меньшей мере 4 часа, по меньшей мере 8 часов, по меньшей мере 16 часов, по меньшей мере 32 часа, по меньшей мере 64 часа или больше 65 часов, или 1-10 часов, 2-10 часов, 4-10 часов, 6-10 часов или 6-9 часов у мыши. В некоторых вариантах осуществления растворимый слитый белок DDpp имеет полупериод существования в плазме *in vivo* по меньшей мере 1 час, по меньшей мере 2 часа, по меньшей мере 4 часа, по меньшей мере 8 часов, по меньшей мере 16 часов, по меньшей мере 32 часа, по меньшей мере 64 часа или больше 65 часов, или 1-10 часов, 2-10 часов, 4-10 часов, 6-10 часов или 6-9 часов у человека.

[0178] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу модификации полупериода существования *in vivo* (например, у мыши или человека) растворимого слитого белка, включающего белок p26 (например, имеющий последовательность SEQ ID NO: 37-43 или 44). В некоторых вариантах осуществления растворимый p26 слитый белок включает один или более мишень-связывающих DDpp. В некоторых вариантах осуществления полупериод существования p26 растворимого слитого белка увеличен или уменьшен путем замены или удаления одного или более аминокислотных остатков, обычно присутствующих в человеческом белке p26, или путем вставки одного или более аминокислотных остатков, которые обычно не присутствуют в человеческом белке p26. В другом варианте осуществления последовательность p26 в растворимом слитом белке модифицирована посредством 1, 2, 3, 4, 5, 10 или 1-20, 1-10, 3-10 или 3-5 аминокислотных замен (консервативных и/или неконсервативных замен), делеций и/или вставок для увеличения или уменьшения полупериода существования растворимого слитого белка *in vivo*. В конкретном варианте осуществления аминокислотный остаток, соответствующий глутамину (Gln, Q) в положении 217 SEQ ID NO: 37 p26, заменен другим аминокислотным остатком. В другом варианте осуществления заменой является Gln217Pro. В другом варианте осуществления последовательность p26 в растворимом слитом белке модифицирована посредством делеции 1-150, 1-100, 1-50, 1-25 или 1-10 аминокислотных остатков для увеличения или уменьшения полупериода существования растворимого слитого белка *in vivo*. В дополнительных вариантах осуществления последовательность p26 в растворимом слитом белке модифицирована посредством 1, 2, 3, 4, 5, 10 или 1-20, 1-10, 3-10 или 3-5 аминокислотных замен (консервативных и/или неконсервативных замен), делеций и/или вставок для увеличения или уменьшения взаимодействия растворимого слитого белка с FcRn.

A. Мультимерные слитые белки DDpp

[0179] В одном варианте осуществления слитый белок DDpp включает больше одного DDpp, где два или более DDpp обладают одинаковой или разной специфичностью. В дополнительных вариантах осуществления слитый белок DDpp включает тандемный повтор одинаковых или разных DD, что позволяет слитому белку DDpp связывать множество мишеней и/или повторяющиеся эпитопы, или разные эпитопы на одной мишени. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp включает по меньшей мере 2, 3, 4 или 5 или больше 5 DDpp. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит 1-3, 1-4, 1-5 или больше 5 разных DDpp. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит по меньшей мере 2, 3, 4 или 5 или больше 5 разных DDpp. Таким образом, слитый белок DDpp может быть мономерным DDpp (т.е. содержащим один DDpp) или мультимерным DDpp (т.е. содержащим больше одного DDpp в тандеме, необязательно функционально связанные линкером). В некоторых вариантах осуществления применение мультимерного DDpp обеспечивает улучшенное (например, синергическое) связывание мишени. В дополнительных вариантах осуществления мультимерный DDpp позволяет направленно взаимодействовать больше чем с одной мишенью при использовании одной конструкции DDpp (например, би-, триспецифичной и т.д.). Соединение двух или более идентичных DDpp приводит к получению мультивалентной молекулы, которая обеспечивает явные преимущества (например, повышенную avidность связывания, кластеризацию мишеней и активацию рецепторов) по сравнению с моновалентными композициями. Соединение двух или более различных DDpp приводит к получению мультивалентной и мультиспецифичной молекулы, которая обладает возможностью связывать больше одного антигена-мишени, независимо или одновременно.

[0180] Мультимерный слитый белок DDpp может быть гомомультимерным DDpp (т.е. содержащим больше одного одинаковых DDpp в тандеме, необязательно связанных линкером(ами) (например, гомодимеры, гомотримеры, гомотетрамеры и т.д.) или гетеромультимерным DDpp (т.е. содержащим два или более DDpp, где присутствует по меньшей мере два разных белка DDpp. Количество мономерного DDpp, включенного в мультимерную композицию, может изменяться в зависимости от варианта осуществления и может определяться, по меньшей мере частично, системой экспрессии, в которой получают DDpp. Впрочем, в некоторых вариантах осуществления слитые белки могут включать мультимеры, содержащие от приблизительно 5 до приблизительно 10 субъединиц DDpp, от приблизительно 10 до приблизительно 15 подгруппам, от приблизительно 15 до приблизительно 20 субъединиц, от приблизительно 20 до приблизительно 25 субъединиц или от приблизительно 25 до приблизительно 30 субъединиц (включая промежуточные числа между перечисленными значениями, а также конечные значения). Кроме того, множество тандемных компонентов слитого белка DDpp могут содержать одинаковые или разные DDpp. В некоторых слитых конструкциях DDpp, DDpp присутствуют в виде мономеров или в виде гомомультимеров, или гетеромеров, таких как гомодимеры или

гетеродимеры, гомотримеры или гетеротримеры, гомотетрамеры или гетеротетрамеры.

[0181] Слитый белок DDpp может быть "моноспецифичным" или "мультиспецифичным". Слитый белок DDpp, который является "мультиспецифичным" (например, биспецифичным, триспецифичным или с большей мультиспецифичностью), распознает и связывается с двумя или более разными эпитопами, присутствующими на одной или более разных молекулах (например, белках, структурах твердых подложек и т.д.).

[0182] В некоторых вариантах осуществления два или более DD слиты вместе в виде мультивалентного DDpp. DD в мультивалентном DDpp могут быть одинаковыми или разными. Таким образом, изобретение относится к гомодимеру DDpp (т.е. DDpp, включающему два идентичных DD), гомомультимер DDpp (т.е. DDpp, включающий три или больше идентичных DD), гетеродимер DDpp (т.е. DDpp, включающий два разных DD) и гетеромультимер DDpp (т.е. DDpp, включающий три или больше DD, где по меньшей мере два из DD являются разными), включающие любые из DD, описанные в настоящем изобретении, необязательно соединенные одним или больше линкерами.

[0183] В некоторых вариантах осуществления два или более DD связаны мультимеризационным доменом или соединены через химическую связь с получением мультивалентного комплекса DD. DD в мультивалентном комплексе DD могут быть одинаковыми или разными. Таким образом, изобретение относится к гомодимерному комплексу DD (т.е. комплекс DD, включающий два идентичных DD), гомомультимерный комплекс DD (т.е. комплекс DD, включающий три или больше идентичных DD), гетеродимерный комплекс DD (т.е. комплекс DD, включающий два разных DD) и гетеромультимерный комплекс DD (т.е. комплекс DD, включающий три или больше DD, где по меньшей мере два из DD являются разными), включающие любые из DD, описанные в настоящем изобретении, необязательно соединенные одним или больше линкерами.

[0184] В одном варианте осуществления мультиспецифичный слитый белок DDpp содержит по меньшей мере два DDpp, которые связываются по меньшей мере с двумя разными эпитопами на одной представляющей интерес мишени (например, CD123, CD33, LeY, CD38, VCMA или CS1, предпочтительно CD123, CD33, LeY или CD38). В другом варианте осуществления слитый DDpp является биспецифичным и специфично связывается с двумя разными мишенями, экспрессируемыми на поверхности клеток двух разных типов. В одном варианте осуществления биспецифичный слитый белок DDpp специфично связывается с мишенью на раковой клетке и мишенью на иммунной эффекторной клетке. В одном варианте осуществления биспецифичный слитый белок DDpp специфично связывает мишень, выраженную на раковой клетке (например, CD123) и цель, экспрессируемую на поверхности Т-лимфоцита (например, CD3). В одном варианте осуществления биспецифичный слитый белок DDpp специфично связывает CD123 и CD33. В одном варианте осуществления биспецифичный слитый белок DDpp специфично связывает CD123 и CD38. В одном варианте осуществления биспецифичный слитый белок DDpp специфично связывает CD123 и LeY.

[0185] В дополнительных вариантах осуществления мультиспецифичный слитый белок DDpp включает по меньшей мере один DDpp, который специфично связывает один эпитоп на представляющей интерес мишени, и по меньшей мере еще один домен или придающую функцию последовательность (например, фрагмент антитела или домен, такой как scFv), который специфично связывается с другим эпитопом на той же мишени, представляющей интерес. В одном варианте осуществления мультиспецифичный слитый белок DDpp включает по меньшей мере один DDpp, который специфично связывается с эпитопом на представляющей интерес мишени, и по меньшей мере один домен или придающую функцию последовательность, например, фрагмент антитела или домен (например, scFv), который специфично связывается с эпитопом на другой мишени, представляющей интерес. В одном варианте осуществления мультиспецифичный слитый белок DDpp включает по меньшей мере один DDpp, который специфично связывается с эпитопом на представляющей интерес мишени, и по меньшей мере один домен или последовательность, которая специфично связывается с эпитопом на другой мишени на той же клетке. В других вариантах осуществления слитый белок DDpp включает по меньшей мере один DDpp и по меньшей мере еще один DDpp или придающую функцию последовательность домена, например, фрагмент антитела или домен, который специфично связывается с твердой подложкой.

[0186] В другом варианте осуществления мультимерный слитый DDpp, включающий 2 или больше DDpp, в свою очередь слит с другими гетерологичными белками (или их субдоменами) и, таким образом, сообщает мультивалентные и мультиспецифичные свойства партнеру по слиянию. Примеры партнеров по слиянию DDpp включают, без ограничения, антитела, субдомены антител (например, scFv или Fc домены), сывороточный альбумин, субдомены сывороточного альбумина, поверхностные рецепторы клеток, альфа-цепь Т-клеточного рецептора (TCR), бета-цепь Т-клеточного рецептора, субдомены поверхностных рецепторов клеток, пептиды, пептидные метки (например, FLAG или msc), фибронектиновые повторы III типа, z-домены, эластин-подобные полипептиды. Количество и расположение DDpp и их соответствующие положения в слитом белке могут изменяться. Например, DDpp могут быть расположены на одном или всех концах партнера по слиянию и/или распределены в гетерологичных субъединицах в партнере по слиянию DDpp.

[0187] В дополнительных вариантах осуществления слитый белок DDpp включает DDpp и полипептидную последовательность, содержащую дополнительный домен. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp включает DDpp и компонент, выбранный из: антитела, фрагмента антитела (например, антиген связывающего домена или его части (например, scFv), эффекторного домена или его части, FcRn-связывающего домена или его части и Fc или его части), сывороточного белка (например, альбумина или его части), цитокина, фактора роста, гормона, визуализирующего средства, метящего средства и пептидной метки. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp включает Fc-домен иммуноглобулина (например, человеческий Fc-домен) или его часть. В

других вариантах осуществления Fc-домен является вариантным человеческим Fc-доменом.

[0188] В некоторых вариантах осуществления DDpp слит с гетерологичным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный полипептид включает полноразмерное антитело или фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления DD слит с: N-концом тяжелой цепи полноразмерного антитела; N-концом легкой цепи полноразмерного антитела; C-концом тяжелой цепи полноразмерного антитела; или C-концом легкой цепи полноразмерного антитела. В других вариантах осуществления DD слит с фрагментом антитела, который представляет собой Fc. В дополнительных вариантах осуществления гетерологичный полипептид включает компонент, выбранный из группы, состоящей из: (i) трансмембранного домена; (ii) мембраносвязанного домена; (iii) человеческого сывороточного альбумина или его фрагмента; (iv) АФП или его фрагмента; (v) р26 АФП или его фрагмента; (vi) внеклеточного домена рецептора или его фрагмента; и (vii) внеклеточного домена внутриклеточного рецептора (например, ядерного белка) или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит гетерологичный полипептид, включающий внеклеточный домен или фрагмент внеклеточного домена рецептора клеточной поверхности.

[0189] В некоторых вариантах осуществления DDpp в слитом белке DDpp входит в более крупный мультидоменный молекулярный комплекс (например, мономерный или мультимерный слитый белок DDpp) и, таким образом, придает функциональные признаки включенного DDpp полученному слитому белку. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp включает DDpp и полипептидную последовательность из антитела, фрагмента антитела, сывороточного белка (например, человеческого сывороточного альбумина) или фрагмента сывороточного белка, или поверхностного рецептора клетки, альфа-цепи Т-клеточного рецептора (TCR), бета-цепи Т-клеточного рецептора, цитокина, фактора роста, гормона или фермента, или их фрагмента. Включение DD в мультидоменные и/или мультифункциональные комплексы обычно может быть выполнено посредством рекомбинантного слияния с другим полипептидом, связывания с другой химической молекулой и связывания ковалентной химической связью с другим полипептидом (или другим требуемым химическим соединением) с использованием методов, известных в уровне техники. Слитые белки DDpp могут дополнительно содержать другие необязательные компоненты, такие как линкеры и другие компоненты, описанные в настоящем изобретении.

В. Адаптеры

[0190] В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp, описанный в настоящем изобретении, представляет собой белок Адаптер. Адаптер включает антигенную детерминанту (AD) и домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД). Адаптер может дополнительно включать дополнительные AD, дополнительные ADBД и/или другие дополнительные домены. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, описанный в настоящем изобретении, включает по меньшей мере один ADBД, включающий D-домен.

[0191] В некоторых вариантах осуществления Адаптер, раскрытый в настоящем изобретении, включает: (а) D-домен (DD), который связывается с CD123, и (b) антигенную детерминанту (AD). В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления Адаптер представляет собой моновалентный Адаптер, включающий один D-домен, который связывает CD123. В некоторых вариантах осуществления Адаптер представляет собой бивалентный Адаптер, включающий два D-домена, которые связывают CD123. В некоторых вариантах осуществления два D-домена, которые связывают CD123, являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления два D-домена, которые связывают CD123, являются разными. В некоторых вариантах осуществления Адаптер представляет собой бивалентный Адаптер, включающий первый D-домен, который связывает CD123, и второй D-домен, который связывает второй AD. В некоторых вариантах осуществления второй AD представляет собой CD33 или LeY. В некоторых вариантах осуществления моновалентный Адаптер включает D-домен, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления моновалентный Адаптер включает D-домен, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления бивалентный Адаптер включает DD, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления бивалентный Адаптер включает D-домен, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления бивалентный Адаптер включает два идентичных D-домена, включающих аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления бивалентный Адаптер включает два идентичных D-домена, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает антигенную детерминанту (AD) p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-43 и 44. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления моновалентный Адаптер включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50-54 или 55. В

некоторых вариантах осуществления моновалентный Адаптер включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления бивалентный Адаптер включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56-60 или 61. В некоторых вариантах осуществления моновалентный Адаптер включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает один или более линкеров. В некоторых вариантах осуществления Адаптер способен направлять иммунный ответ против клетки, экспрессирующей CD123, в анализе *in vitro*, включающем Адаптер, клетку, экспрессирующую CD123, и иммунную эффекторную клетку, экспрессирующую CAR, включающий ADBD, который связывает AD, содержащийся в Адаптере, например, CAR, включающий D-домен, который связывает p26 АФП.

[0192] В некоторых вариантах осуществления Адаптер, раскрытый в настоящем изобретении, включает: (a) D-домен, который связывается с CD123, и (b) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывает AD p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-43 и 44. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления ADBD, который связывается с AD p26 АФП, включает D-домен, который связывается с AD p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 70-73 и 92-94. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает один или более линкеров. В некоторых вариантах осуществления Адаптер способен направлять иммунный ответ против клетки, экспрессирующей CD123, в анализе *in vitro*, включающем Адаптер, клетку, экспрессирующую CD123, и иммунную эффекторную клетку, экспрессирующую CAR, включающий AD p26 АФП.

[0193] В Адаптере, раскрытом в настоящем изобретении, AD может быть N-концевым по отношению к ADBD. В альтернативе ADBD может быть N-концевым по отношению к AD. В некоторых вариантах осуществления AD и ADBD слиты непосредственно. В некоторых вариантах осуществления AD и ADBD слиты через линкер (белковый линкер или химический линкер) или другой белковый домен (например,

функциональный домен). В некоторых вариантах осуществления Адаптер, раскрытый в настоящем изобретении, включает по меньшей мере один ADBD, включающий D-домен.

[0194] В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает линкер, расположенный между ADBD и другим функциональным доменом Адаптера. В некоторых вариантах осуществления линкер расположен между двумя ADBD Адаптера. В некоторых вариантах осуществления линкер расположен между AD и ADBD Адаптера. Подходящие линкеры для соединения двух или более функциональных доменов Адаптера будут известны специалистам в данной области и обычно могут быть любым линкером, используемым в данной области для соединения пептидов, белков или других органических молекул. Иллюстративные линкеры представлены в настоящем изобретении. В конкретных вариантах осуществления линкер(ы) подходит для конструирования белков или полипептидов, предназначенных для фармацевтического применения. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, раскрытый в настоящем изобретении, включает по меньшей мере один ADBD, включающий D-домен.

[0195] В дополнение к AD (или множеству AD) и ADBD (или множеству ADBD), Адаптер, раскрытый в настоящем изобретении, может дополнительно включать дополнительный домен или дополнительные домены, например, домен, который обеспечивает увеличенный полупериод существования.

[0196] В некоторых вариантах осуществления Адаптер или ADBD в Адаптере деиммунизированы.

[0197] Адаптеры, раскрытые в настоящем изобретении, имеют применения, включающие, без ограничения, диагностические, аналитические и терапевтические применения. В конкретных вариантах осуществления Адаптеры применяются в комбинации с химерными антигенными рецепторами (CAR-рецепторами), раскрытыми в настоящем изобретении, экспрессируемыми на поверхности клеток, например, для уничтожения клетки-мишени.

[0198] Адаптеры, подходящие для применения в сочетании с DDpp (например, Адаптер и CAR), раскрытым в настоящем изобретении, были раскрыты в публ. междунар. заявок WO 2016164305, WO 2016164308A1, WO 2019099440 и WO 2019099433, патентах США 10,662,248 и 10,647,775 и заявках на патент США 20200223934 и 20210002381, которые включены в настоящее описание путем ссылки во всех отношениях.

i. Антигенные детерминанты (AD)

[0199] Адаптер, раскрытый в настоящем изобретении, включает по меньшей мере одну антигенную детерминанту (AD). В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает одну AD. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает две или более AD. Если Адаптер включает две или более AD, AD могут быть одинаковыми или разными.

[0200] В некоторых вариантах осуществления AD представляет собой эпитоп p26 АФП. В других вариантах осуществления AD включает 5-25, 5-50, 5-75, 5-100, 5-125 или 5-150 аминокислотных остатков, больше 150 аминокислотных остатков или все аминокислотные остатки SEQ ID NO: 37. В других вариантах осуществления AD включает

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В других вариантах осуществления AD включает 5-25, 5-50, 5-75, 5-100, 5-125 или 5-150 аминокислотных остатков, больше 150 аминокислотных остатков или все аминокислотные остатки SEQ ID NO: 39. В других вариантах осуществления AD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В других вариантах осуществления AD включает аминокислотные остатки SEQ ID NO: 37-43 или 44.

[0201] В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает внеклеточный домен ВСМА (например, полипептид, включающий последовательность SEQ ID NO: 34). В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает 5-25, 5-50, 5-75, 5-100, 5-125 или 5-150 аминокислотных остатков, больше 150 аминокислотных остатков или все аминокислотные остатки SEQ ID NO: 34.

[0202] В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает внеклеточный домен CD123 (например, полипептид, включающий последовательность SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает 5-25, 5-50, 5-75, 5-100, 5-125 или 5-150 аминокислотных остатков, больше 150 аминокислотных остатков или все аминокислотные остатки SEQ ID NO: 1.

[0203] В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает внеклеточный домен CD19 (например, полипептид, включающий последовательность SEQ ID NO: 95). В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает 5-25, 5-50, 5-75, 5-100, 5-125 или 5-150 аминокислотных остатков, больше 150 аминокислотных остатков или все аминокислотные остатки SEQ ID NO: 95.

[0204] В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает внеклеточный домен CS1 (например, полипептид, включающий последовательность SEQ ID NO: 35). В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает 5-25, 5-50, 5-75, 5-100, 5-125 или 5-150 аминокислотных остатков, больше 150 аминокислотных остатков или все аминокислотные остатки SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает внеклеточный домен CD20. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает внеклеточный домен CD22. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает внеклеточный домен CD37. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает внеклеточный домен HER2. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает внеклеточный домен CD45. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает внеклеточный домен CD26, CD30, CD33 или CD38.

[0205] В некоторых вариантах осуществления AD является эпитопом АФП. В других вариантах осуществления AD включает 5-25, 5-50, 5-75, 5-100, 5-125 или 5-150 аминокислотных остатков, больше 150 аминокислотных остатков или все аминокислотные остатки SEQ ID NO: 36.

[0206] В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает белок p26 (например, имеющий последовательность SEQ ID NO: 37-43 или 44). В некоторых вариантах осуществления Адаптер имеет полупериод существования в плазме *in vivo* по меньшей мере 1 час, по меньшей мере 2 часа, по меньшей мере 4 часа, по меньшей мере 8

часов, по меньшей мере 16 часов, по меньшей мере 32 часа, по меньшей мере 64 часа или больше. В некоторых вариантах осуществления Адаптер имеет полупериод существования в плазме *in vivo* по меньшей мере 1 час, по меньшей мере 2 часа, по меньшей мере 4 часа, по меньшей мере 8 часов, по меньшей мере 16 часов, по меньшей мере 32 часа, по меньшей мере 64 часа или больше 65 часов, или 1-10 часов, 2-10 часов, 4-10 часов, 6-10 часов или 6-9 часов у мыши. В некоторых вариантах осуществления Адаптер имеет полупериод существования в плазме *in vivo* по меньшей мере 1 час, по меньшей мере 2 часа, по меньшей мере 4 часа, по меньшей мере 8 часов, по меньшей мере 16 часов, по меньшей мере 32 часа, по меньшей мере 64 часа или больше 65 часов, или 1-10 часов, 2-10 часов, 4-10 часов, 6-10 часов или 6-9 часов у человека.

[0207] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу модификации полупериода существования *in vivo* (например, у мыши или человека) Адаптера, включающего белок р26 (например, имеющий последовательность SEQ ID NO: 37-43 или 44). В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает один или более мишень-связывающих DDpp. В некоторых вариантах осуществления полупериод существования Адаптера увеличен или уменьшен путем замены или делеции одного или более аминокислотных остатков, обычно присутствующих в белке р26 человека, или путем вставки одного или более аминокислотных остатков, которые обычно не присутствуют в белке р26 человека. В другом варианте осуществления последовательность р26 Адаптера модифицирована посредством 1, 2, 3, 4, 5, 10 или 1-20, 1-10, 3-10 или 3-5 аминокислотных замен (консервативных и/или неконсервативных замен), делеций и/или вставок для увеличения или уменьшения полупериода существования Адаптера *in vivo*. В конкретном варианте осуществления аминокислотный остаток, соответствующий глутамину (Gln, Q) в положении 217 р26 (SEQ ID NO: 37), заменен другими аминокислотными остатками. В другом варианте осуществления заменой является Gln217Pro. В другом варианте осуществления последовательность р26 Адаптера модифицирована посредством делеции 1-150, 1-100, 1-50, 1-25 или 1-10 аминокислотных остатков для увеличения или уменьшения полупериода существования Адаптера *in vivo*. В дополнительных вариантах осуществления последовательность р26 Адаптера модифицирована посредством 1, 2, 3, 4, 5, 10 или 1-20, 1-10, 3-10 или 3-5 аминокислотных замен (консервативных и/или неконсервативных замен), делеций и/или вставок для увеличения или уменьшения взаимодействия Адаптера с FcRn.

[0208] В некоторых вариантах осуществления AD (например, в Адаптере и/или на клетке-мишени) представляет собой AD, который присутствует в природном белке или другой молекуле. В некоторых вариантах осуществления AD представляет собой AD, который является эндогенным для человека.

[0209] В некоторых вариантах осуществления AD является эпитопом человеческого внутриклеточного белка. В других вариантах осуществления AD является эпитопом человеческого внутриклеточного белка, выбранного из: Tyk2, Jak1, Jak2, Jak3, LCK, ZAP-70 и GRB2. В других вариантах осуществления AD включает 5-25, 5-50, 5-75, 5-100, 5-125 или 5-150 аминокислотных остатков, больше 150 аминокислотных остатков или все

аминокислотные остатки внутриклеточного белка.

[0210] В некоторых вариантах осуществления представляющая интерес мишень, специфично связываемая ADBD Адаптера, сама представляет собой AD из другого Адаптера, имеющего другую последовательность.

ii. Домены, связывающие антигенные детерминанты (ADBД)

[0211] Адаптер, раскрытый в настоящем изобретении, включает по меньшей мере один домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД). В некоторых вариантах осуществления Адаптер содержит один ADBД. В некоторых вариантах осуществления Адаптер содержит по меньшей мере 2, 3, 4 или 5 или больше 5 доменов ADBД. В некоторых вариантах осуществления Адаптер содержит 1-3, 1-4, 1-5 или больше 5 разных ADBД. В некоторых вариантах осуществления Адаптер содержит по меньшей мере 2, 3, 4 или 5 или больше 5 разных ADBД. Таким образом, Адаптер может включать мономерный ADBД (т.е. содержащий один домен, связывающий антигенную детерминанту) или мультимерные ADBД (т.е. содержащие больше одного связывающего антигенную детерминанту домена в тандеме, необязательно функционально связанные линкером). В некоторых вариантах осуществления применение мультимерного Адаптера обеспечивает улучшенное (например, синергическое) связывание мишени. В дополнительных вариантах осуществления применение мультимерного Адаптера обеспечивает направленное взаимодействие больше чем с одной мишенью при использовании одной конструкции Адаптера (например, би-, триспецифичной и т.д.). В некоторых вариантах осуществления Адаптер, раскрытый в настоящем изобретении, включает по меньшей мере один ADBД, включающий D-домен. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, раскрытый в настоящем изобретении, включает больше одного ADBД, включающего D-домен. В некоторых вариантах осуществления все ADBД Адаптера, раскрытые в настоящем изобретении, включают D-домен.

[0212] Мультимерный Адаптер является гомомультимерным (т.е. содержит больше одного одинаковых ADBД, необязательно связанных линкером(ами) (например, гомодимеры, гомотримеры, гомотетрамеры и т.д.) или Адаптер является гетеромультимерным (т.е. содержит два или более доменов, связывающих антигенные детерминанты, где присутствует по меньшей мере два разных домена, связывающих антигенные детерминанты). Количество ADBД, включенных в какой-либо конкретный Адаптер, может изменяться в зависимости от варианта осуществления и может быть определяться, по меньшей мере частично, системой экспрессии, в которой получают Адаптер. Впрочем, в нескольких вариантах осуществления слитые белки могут включать мультимеры, содержащие от приблизительно 5 до приблизительно 10 ADBД, от приблизительно 10 до приблизительно 15 доменов ADBД, от приблизительно 15 до приблизительно 20 ADBД, от приблизительно 20 до приблизительно 25 доменов ADBД или от приблизительно 25 до приблизительно 30 ADBД (включая промежуточные числа между перечисленными значениями, а также конечные значения). Кроме того, множеств доменов Адаптера могут содержать одинаковые или разные ADBД. В некоторых вариантах

осуществления 2, 3, 4, 5 или больше 5 доменов расположены в тандеме. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, раскрытый в настоящем изобретении, включает по меньшей мере один ADBD, включающий D-домен. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, раскрытый в настоящем изобретении, включает больше одного ADBD, включающего D-домен. В некоторых вариантах осуществления все ADBD Адаптера, раскрытого в настоящем изобретении, включают D-домен.

[0213] В одном варианте осуществления Адаптер включает два или более функционально связанных ADBD. В одном варианте осуществления Адаптер включает два ADBD, которые связываются с одинаковыми или разными AD на антигене-мишени. Соединение двух или более идентичных ADBD, которые связываются с одним и тем же антигеном-мишенью, приводит к получению мультивалентной молекулы, которая обеспечивает явные преимущества (например, повышенную avidность связывания, кластеризацию мишеней и активацию рецепторов) по сравнению с композициями, которые содержат только один ADBD к антиген-мишени. В другом варианте осуществления Адаптер включает два ADBD, которые связываются с разными антигенами. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает два ADBD, которые связываются с разными антигенами на одной и той же клетке. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает два ADBD, которые связываются с разными антигенами на разных клетках. Соединение двух или более ADBD приводит к получению мультивалентного и мультиспецифичного Адаптера, который обладает способностью связывать больше одного антигена-мишени, независимо или одновременно. В некоторых вариантах осуществления мультивалентный Адаптер обладает способностью связывать один и тот же антиген-мишень одновременно. В некоторых вариантах осуществления мультивалентный Адаптер обладает способностью связывать разные антигена-мишени одновременно. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает два или более функционально связанных ADBD, которые разделены Антигенной детерминантой. В некоторых вариантах осуществления Антигенная детерминанта имеет длину по меньшей мере 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления Антигенная детерминанта имеет длину 5-500, 5-400, 10-300, 5-200, 50-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100, 10-50, 50-500, 50-400, 50-300, 50-200, 50-100 50-75, 100-500, 100-400, 100-300, 100-200 или 100-150 аминокислот. В других вариантах осуществления Адаптер включает два или более функционально связанных ADBD, которые разделены Антигенной детерминантой ВСМА. В других вариантах осуществления Адаптер включает два или более функционально связанных ADBD, которые разделены Антигенной детерминантой р26 АФП. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, раскрытый в настоящем изобретении, включает по меньшей мере один ADBD, включающий D-домен. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, раскрытый в настоящем изобретении, включает больше одного ADBD, включающего D-домен. В некоторых вариантах осуществления все ADBD Адаптера, раскрытые в настоящем изобретении, включают D-домен.

[0214] ADBD в Адаптере, раскрытом в настоящем изобретении, может связываться с любым AD. В некоторых вариантах осуществления ADBD связывается с CD123 (например, полипептидом, включающим последовательность SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления ADBD связывается с р26 АФП (например, полипептидом, включающим последовательность SEQ ID NO: 37-43 или 44, предпочтительно SEQ ID NO: 37 или 39). В некоторых вариантах осуществления ADBD связывается с ВСМА (например, полипептид, включающий последовательность SEQ ID NO: 34). В некоторых вариантах осуществления ADBD связывается с CD22. В некоторых вариантах осуществления ADBD связывается с CD19. В некоторых вариантах осуществления ADBD связывается с CD20. В некоторых вариантах осуществления ADBD связывается с CD37. В некоторых вариантах осуществления ADBD связывается с CS1. В некоторых вариантах осуществления ADBD связывается с HER2. В некоторых вариантах осуществления ADBD связывается с CD45. В некоторых вариантах осуществления ADBD в Адаптере, раскрытом в настоящем изобретении, специфично связывается с AD из CD26, CD30, CD33 или CD38 человека. Адаптер может быть "моноспецифичным" или "мультиспецифичным". Адаптер, который является "мультиспецифичным" (например, биспецифичным, триспецифичным или имеющим большую мультиспецифичность) распознает и связывается с двумя или более разными эпитопами, присутствующими на одной или более различных молекулах. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, раскрытый в настоящем изобретении, включает по меньшей мере один ADBD, включающий D-домен. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, раскрытый в настоящем изобретении, включает больше одного ADBD, включающего D-домен. В некоторых вариантах осуществления все ADBD Адаптера, раскрытого в настоящем изобретении, включают D-домен.

[0215] В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает домен (например, внеклеточный домен) CD123 (например, полипептид, включающий последовательность SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает домен (например, внеклеточный домен) ВСМА (например, полипептид, включающий последовательность SEQ ID NO 34). В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает домен (например, внеклеточный домен) CD22. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает домен (например, внеклеточный домен) CD19. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает домен (например, внеклеточный домен) CS1. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает домен (например, внеклеточный домен) HER2. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает домен (например, внеклеточный домен) CD45. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает домен (например, внеклеточный домен) CD26, CD30, CD33 или CD38. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает фрагмент домена. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает фрагмент домена, который имеет длину по меньшей мере 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления Антигенная детерминанта имеет длину 5-500, 5-400, 10-300, 5-200, 50-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100, 10-50, 50-500, 50-400, 50-300, 50-200, 50-100

50-75, 100-500, 100-400, 100-300, 100-200 или 100-150 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, раскрытый в настоящем изобретении, включает по меньшей мере один ADBD, включающий D-домен. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, раскрытый в настоящем изобретении, включает больше одного ADBD, включающего D-домен. В некоторых вариантах осуществления все ADBD Адаптера, раскрытого в настоящем изобретении, включают D-домен.

[0216] В некоторых вариантах осуществления Адаптер содержит по меньшей мере два ADBD, которые связывают и перекрестно сшивают один или более антигенов-мишеней, связываемых ADBD, и/или комплексов, содержащих антиген-мишень (антигены-мишени). В некоторых вариантах осуществления перекрестно сшиваемый антиген(ы) находится на одной и той же клетке. В некоторых вариантах осуществления перекрестно сшиваемый антиген(ы) находится на разных клетках. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает два или более функционально связанных ADBD, которые разделены Антигенной детерминантой (например, доменом, описанным выше). В некоторых вариантах осуществления Антигенная детерминанта имеет длину по меньшей мере 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления Антигенная детерминанта имеет длину 5-500, 5-400, 10-300, 5-200, 50-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100, 10-50, 50-500, 50-400, 50-300, 50-200, 50-100 50-75, 100-500, 100-400, 100-300, 100-200 или 100-150 аминокислот. В других вариантах осуществления Адаптер включает два или более функционально связанных ADBD, которые разделены Антигенной детерминантой ВСМА. В других вариантах осуществления Адаптер включает два или более функционально связанных ADBD, которые разделены Антигенной детерминантой CD123. В других вариантах осуществления Адаптер включает два или более функционально связанных ADBD, которые разделены Антигенной детерминантой CD26, CD30, CD33 или CD38. В других вариантах осуществления Адаптер включает два или более функционально связанных ADBD, которые разделены антигенной детерминантой р26 АФП. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, раскрытый в настоящем изобретении, включает по меньшей мере один ADBD, включающий D-домен. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, раскрытый в настоящем изобретении, включает больше одного ADBD, включающего D-домен. В некоторых вариантах осуществления все ADBD Адаптера, раскрытого в настоящем изобретении, включают D-домен.

[0217] В некоторых вариантах осуществления Адаптер содержит по меньшей мере два одинаковых ADBD (т.е. является мультивалентным). В некоторых вариантах осуществления мультивалентный Адаптер способен связывать две или более одинаковых антигенов-мишеней одновременно. В некоторых вариантах осуществления Адаптер является мультивалентным и способен связывать один и тот же антиген-мишень одновременно. В некоторых вариантах осуществления мультивалентный Адаптер включает два или более функционально связанных ADBD, которые разделены Антигенной детерминантой. В некоторых вариантах осуществления Антигенная детерминанта имеет длину по меньшей мере 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления Антигенная детерминанта имеет длину 5-500, 5-400, 10-300, 5-200, 50-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100, 10-50, 50-500, 50-400, 50-300, 50-200, 50-100 50-75, 100-500, 100-400, 100-300, 100-200 или 100-150 аминокислот. В других вариантах осуществления Адаптер включает два или более функционально связанных ADBD, которые разделены Антигенной детерминантой CD123. В других вариантах осуществления мультивалентный Адаптер включает два или более функционально связанных ADBD, которые разделены Антигенной детерминантой ВСМА. В других вариантах осуществления мультивалентный Адаптер включает два или более функционально связанных ADBD, которые разделены антигенной детерминантой р26 АФП. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, раскрытый в настоящем изобретении, включает по меньшей мере один ADBD, включающий D-домен. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, раскрытый в настоящем изобретении, включает больше одного ADBD, включающего D-домен. В некоторых вариантах осуществления все ADBD Адаптера, раскрытого в настоящем изобретении, включают D-домен.

[0218] В некоторых вариантах осуществления Адаптер содержит по меньшей мере два ADBD, которые связываются с разными антигенами (т.е. является мультиспецифичным). В некоторых вариантах осуществления мультиспецифичный Адаптер способен связывать разные антигены-мишени одновременно. В некоторых вариантах осуществления Адаптер также является мультивалентным и способен связывать один и тот же антиген-мишень одновременно. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифичный Адаптер включает два или более функционально связанных ADBD, которые разделены Антигенной детерминантой. В некоторых вариантах осуществления Антигенная детерминанта имеет длину по меньшей мере 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления Антигенная детерминанта имеет длину 5-500, 5-400, 10-300, 5-200, 50-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100, 10-50, 50-500, 50-400, 50-300, 50-200, 50-100 50-75, 100-500, 100-400, 100-300, 100-200 или 100-150 аминокислот. В других вариантах осуществления Адаптер включает два или более функционально связанных ADBD, которые разделены Антигенной детерминантой CD123. В других вариантах осуществления Адаптер включает два или более функционально связанных ADBD, которые разделены Антигенной детерминантой ВСМА. В других вариантах осуществления Адаптер включает два или более функционально связанных ADBD, которые разделены антигенной детерминантой р26 АФП. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, раскрытый в настоящем изобретении, включает по меньшей мере один ADBD, включающий D-домен. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, раскрытый в настоящем изобретении, включает больше одного ADBD, включающего D-домен. В некоторых вариантах осуществления все ADBD Адаптера, раскрытого в настоящем изобретении, включают D-домен.

[0219] В одном варианте осуществления мультиспецифичный Адаптер содержит по меньшей мере два ADBD, которые связываются по меньшей мере с двумя разными эпитопами на одной представляющей интерес мишени (например, CD123). В

дополнительных вариантах осуществления мультиспецифичный Адаптер включает по меньшей мере один ADBD, который специфично связывает один эпитоп на представляющей интерес мишени, и по меньшей мере еще один ADBD, который специфично связывается с другим эпитопом на том же антигене-мишени. В одном варианте осуществления мультиспецифичный Адаптер включает по меньшей мере один ADBD, который специфично связывается с эпитопом на первом антигене-мишени, и по меньшей мере один ADBD, который специфично связывается с эпитопом на втором антигене. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает по меньшей мере один ADBD, который специфично связывается с эпитопом на первом антигене-мишени на клетке, и по меньшей мере один ADBD, который специфично связывается с эпитопом на втором антигене на той же клетке. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает по меньшей мере один ADBD, который специфично связывается с эпитопом на первом антигене-мишени на клетке, и по меньшей мере один ADBD, который специфично связывается с эпитопом на втором антигене на другой клетке. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, раскрытый в настоящем изобретении, включает по меньшей мере один ADBD, включающий D-домен. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, раскрытый в настоящем изобретении, включает больше одного ADBD, включающего D-домен. В некоторых вариантах осуществления все ADBD Адаптера, раскрытого в настоящем изобретении, включают D-домен.

[0220] В другом варианте осуществления Адаптер включает 2 или больше ADBD, которые функционально связаны с другими гетерологичными белками (или их субдоменами) и, таким образом, сообщают мультивалентные, мультиспецифичные и/или функциональные свойства (например, фармакокинетику, такую как увеличенный полупериод существования, или фармакодинамику, такую как повышенную функцию) партнера по слиянию слитому белку Адаптера. Примеры партнеров по слиянию Адаптера включают, без ограничения, антитела, субдомены антител (например, scFv или Fc домены), сывороточный альбумин, субдомены сывороточного альбумина, поверхностные рецепторы клеток, альфа-цепь Т-клеточного рецептора (TCR), бета-цепь Т-клеточного рецептора, субдомены поверхностных рецепторов клеток, пептиды, пептидные метки (например, FLAG или тус). Количество и расположение ADBD и их соответствующие положения в Адаптере могут изменяться. Например, ADBD могут быть расположены на одном или всех концах партнера по слиянию и/или распределены в гетерологичных субъединицах в партнере по слиянию Адаптера. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает 2 или больше ADBD, которые разделены гетерологичным белком (например, Антигенной детерминантой). В некоторых вариантах осуществления гетерологичный белок имеет длину по меньшей мере 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный белок имеет длину 5-500, 5-400, 10-300, 5-200, 50-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100, 10-50, 50-500, 50-400, 50-300, 50-200, 50-100 50-75, 100-500, 100-400, 100-300, 100-200 или 100-150 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, раскрытый в настоящем изобретении,

включает по меньшей мере один ADBD, включающий D-домен. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, раскрытый в настоящем изобретении, включает больше одного ADBD, включающего D-домен. В некоторых вариантах осуществления все ADBD Адаптера, раскрытого в настоящем изобретении, включают D-домен.

[0221] В одном варианте осуществления Адаптер является биспецифичным и содержит ADBDs, которые специфично связываются с двумя разными антигенами-мишенями. В других вариантах осуществления биспецифичный Адаптер специфично связывается с двумя разными антигенами-мишенями, экспрессируемыми на поверхности клеток двух разных типов. В других вариантах осуществления биспецифичный Адаптер специфично связывается с двумя разными антигенами-мишенями, экспрессируемыми на поверхности опухолевой клетки. В других вариантах осуществления биспецифичный Адаптер специфично связывается с двумя разными антигенами-мишенями, экспрессируемыми на поверхности клетки ОМЛ (например, CD123 и CD33 или LeY). В одном варианте осуществления биспецифичный Адаптер связывается с антигенами-мишенями, экспрессируемыми на разных клетках. В другом варианте осуществления биспецифичный Адаптер связывается с антигенами-мишенями, экспрессируемыми на разных опухолевых клетках. В другом варианте осуществления биспецифичный Адаптер связывается с антигенами-мишенями, экспрессируемыми на разных клетках в сосудистой сети опухоли или микроокружении опухоли. В одном варианте осуществления биспецифичный Адаптер специфично связывается с раковой клеткой-мишенью и иммунной эффекторной клеткой-мишенью. В одном варианте осуществления биспецифичный Адаптер специфично связывает мишень, экспрессируемую на раковой клетке (например, CD123), и мишень, экспрессируемую на поверхности Т-лимфоцита (например, CD3). В некоторых вариантах осуществления биспецифичный Адаптер способен связывать разные антигены-мишени одновременно. В некоторых вариантах осуществления биспецифичный Адаптер включает два или более функционально связанных ADBD, которые разделены Антигенной детерминантой. В некоторых вариантах осуществления Антигенная детерминанта имеет длину по меньшей мере 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления Антигенная детерминанта имеет длину 5-500, 5-400, 10-300, 5-200, 50-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100, 10-50, 50-500, 50-400, 50-300, 50-200, 50-100 50-75, 100-500, 100-400, 100-300, 100-200 или 100-150 аминокислот. В других вариантах осуществления Адаптер включает два или более функционально связанных ADBD, которые разделены Антигенной детерминантой CD123. В других вариантах осуществления Адаптер включает два или более функционально связанных ADBD, которые разделены Антигенной детерминантой BCMA. В других вариантах осуществления Адаптер включает два или более функционально связанных ADBD, которые разделены Антигенной детерминантой p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, раскрытый в настоящем изобретении, включает по меньшей мере один ADBD включающий D-домен. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, раскрытый в настоящем изобретении, включает больше

одного ADBD, включающего D-домен. В некоторых вариантах осуществления все ADBD Адаптера, раскрытого в настоящем изобретении, включают D-домен.

[0222] В некоторых вариантах осуществления, где Адаптер включает больше одного ADBD, ADBD может быть любым из типов ADBD, обсуждаемых в настоящем изобретении. Например, ADBD может быть антителом, его антигенсвязывающим фрагментом, ScFv, связывающим доменом на основе альтернативного каркаса, D-доменом, Т-клеточным рецептором или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, раскрытый в настоящем изобретении, включает по меньшей мере один ADBD, включающий D-домен. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, раскрытый в настоящем изобретении, включает больше одного ADBD, включающего D-домен. В некоторых вариантах осуществления все ADBD Адаптера, раскрытого в настоящем изобретении, включают D-домен.

[0223] В некоторых вариантах осуществления, где Адаптер включает больше одного ADBD, такие ADBD могут быть антигенсвязывающими молекулами одного и того же типа или могут отличаться. Например, Адаптер может включить два ADBD, которые являются D-доменами. Два ADBD, которые являются D-доменами, могут быть одинаковыми или разными. Адаптер также может включать ADBD, который представляет собой D-доменом, и ADBD, который представляет собой scFv. Адаптер также может включать ADBD, который является Т-клеточным рецептором или его антигенсвязывающим фрагментом, и ADBD, который представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает два или более функционально связанных ADBD, которые разделены Антигенной детерминантой. В некоторых вариантах осуществления Антигенная детерминанта имеет длину по меньшей мере 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления Антигенная детерминанта имеет длину 5-500, 5-400, 10-300, 5-200, 50-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100, 10-50, 50-500, 50-400, 50-300, 50-200, 50-100 50-75, 100-500, 100-400, 100-300, 100-200 или 100-150 аминокислот. В других вариантах осуществления Адаптер включает два или более функционально связанных ADBD, которые разделены Антигенной детерминантой CD123. В других вариантах осуществления Адаптер включает два или более функционально связанных ADBD, которые разделены Антигенной детерминантой ВСМА. В других вариантах осуществления Адаптер включает два или более функционально связанных ADBD, которые разделены Антигенной детерминантой р26 АФП. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, раскрытый в настоящем изобретении, включает по меньшей мере один ADBD, включающий D-домен. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, раскрытый в настоящем изобретении, включает больше одного ADBD, включающего D-домен. В некоторых вариантах осуществления все ADBD Адаптера, раскрытого в настоящем изобретении, включают D-домен.

[0224] В некоторых вариантах осуществления ADBD Адаптера деиммунизирован. В некоторых вариантах осуществления ADBD Адаптера деиммунизирован путем замены одного или более аминокислотных остатков в предсказанных Т-клеточных эпитопах с

целью уменьшения связывания с молекулами МНС хозяина.

[0225] В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с антигеном-мишенью, содержащим AD, представляющую интерес, и не оказывает заметного влияния на функцию мишени. В альтернативе, в некоторых вариантах осуществления, Адаптер включает ADBD, который связывается с антигеном-мишенью, содержащим AD, представляющую интерес, и полностью или частично ингибирует, антагонистически воздействует, агонистически воздействует, блокирует, повышает, стимулирует или нарушает биологическую активность мишени. Связывание может быть идентифицировано как агонистическое или антагонистическое и определено с использованием или стандартной модификацией анализов, биоанализов и/или моделей на животных, известных в данной области для оценки такой активности.

[0226] Агонист Адаптера относится к Адаптеру, который некоторым образом повышает или улучшает биологическую активность мишени Адаптера или имеет биологическую активность, сопоставимую с известным агонистом мишени Адаптера. В другом варианте осуществления Адаптер является антагонистом мишени, которую он связывает. Антагонист Адаптера относится к Адаптеру, полностью или частично блокирующему или некоторым образом нарушающему биологическую активность мишени Адаптера или имеющему биологическую активность, сопоставимую с известным антагонистом или ингибитором мишени Адаптера.

[0227] В одном варианте осуществления Адаптер специфично связывает представляющую интерес мишень, которая является сывороточным белком. В одном варианте осуществления Адаптер специфично связывает сывороточный белок, выбранный из: сывороточного альбумина (например, человеческого сывороточного альбумина (HSA)), тироксинсвязывающего белка, трансферрина, фибриногена и иммуноглобулина (например, IgG, IgE и IgM). Без ограничения теорией, считается, что связывание Адаптера с белком-носителем придает Адаптеру улучшенный фармакодинамический профиль, который включает, без ограничения, улучшенное направленное взаимодействие с опухолью, проникновение в опухоль, диффузию внутрь опухоли и улучшенную терапевтическую активность по сравнению с Адаптером, в котором отсутствует последовательность связывания белка-носителя (см., например, WO 01/45746, содержание которой полностью включено в настоящее описание путем ссылки).

iii. Функциональный домен(ы) Адаптера

[0228] В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает первую антигенную детерминанту (AD), домен, который связывается со второй антигенной детерминантой (ADBД), и дополнительно включает функциональный домен, который обеспечивает одно или более дополнительных требуемых свойств (например, улучшенное производство) и/или фармакокинетические или фармакодинамические свойства (например, улучшенный полупериод существования). Функциональный домен Адаптера может быть расположен между AD и ADBD. Адаптером может также быть расположен на N-конце относительно AD и ADBD, или на C-конце относительно AD и ADBD. В некоторых

вариантах осуществления, где Адаптер включает две или более AD, функциональный домен Адаптера может быть расположен между двумя или более AD, на N-конце относительно двух или более AD или на C-конце относительно двух или более AD. В некоторых вариантах осуществления, где Адаптер включает два или более ADBD, функциональный домен Адаптера может быть расположен между двумя или более ADBD, на N-конце относительно двух или более ADBD или на C-конце относительно двух или более ADBD.

[0229] В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает функциональный домен, выбранный из: Fc или вариантного Fc (например, домена человеческого Fc или вариантного Fc) или его фрагмента, сывороточного белка (например, человеческого сывороточного альбумина) или его фрагмента; FcRn-связывающего домена; связывающего домена сывороточного белка; цитокина, фактора роста, гормона или фермента; визуализирующего средства; метящего средства; и пептидной метки.

[0230] Функциональный домен(ы) Адаптера может быть получен природно или в результате рекомбинантной инженерии (например, фагового дисплея, XenoMouse или синтетически). В некоторых вариантах осуществления функциональный домен Адаптера улучшает полупериод существования, повышает или снижает антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или повышает или снижает активность комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

[0231] В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает функциональный домен, выбранный из: Fc или вариантного Fc (например, человеческого Fc или домена вариантного человеческого Fc) или его фрагмента или производного, сывороточного белка (например, человеческого сывороточного альбумина) или его фрагмента или производного (например, связывающего домена сывороточного белка); FcRn-связывающего домена; и связывающего домена сывороточного белка.

[0232] В одном варианте осуществления Адаптер включает функциональный домен, включающий эффекторный домен антитела или производное эффекторного домена антитела, придающий одну или более эффекторных функций Адаптеру, таких как способность связываться с одним или больше Fc-рецепторами. В некоторых вариантах осуществления функциональный домен включает один или более доменов CH2 и/или CH3 антитела, имеющего эффекторную функцию, обеспечиваемую доменами CH2 и CH3. В некоторых вариантах осуществления функциональный домен включает одно или более производных доменов CH2 и/или CH3 антитела, имеющего эффекторную функцию, обеспечиваемую доменами CH2 и CH3. Другие последовательности, которые могут быть включены в Адаптер для обеспечения эффекторной функции и охвачены изобретением, будут известны специалистам в данной области и могут быть обычным образом выбраны и сконструированы в Адаптере, охваченном в настоящем изобретении, в зависимости от требуемой эффекторной функции(й).

[0233] В одном варианте осуществления Адаптер включает функциональный домен, который повышает антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC),

обеспечиваемую Адаптером (см., например, Bruhns *et al.*, Blood 113: 3716-3725 (2009); Shields *et al.*, J. Biol. Chem. 276: 6591-6604 (2001); Lazar *et al.*, PNAS 103: 4005-4010 (2006); Stavenhagen *et al.*, Cancer Res. 67: 8882-8890 (2007); Horton *et al.*, Cancer Res. 68: 8049-8057 (2008); Zalevsky *et al.*, Blood 113: 3735-3743 (2009); Bruckheimer, Neoplasia 11: 509-517 (2009); WO2006/020114; Strohl, Curr. Op. Biotechnol. 20: 685-691 (2009); и WO2004/074455, которые полностью включены в настоящее описание путем ссылки). Примеры инженерных модификаций фрагментов Fc, придающих эффекторную функцию, содержащихся в функциональном домене Адаптера, которые увеличивают ADCC, включают одну или более модификаций, соответствующих следующим: IgG1-S298A, E333A, K334A; IgG1-S239D, I332E; IgG1-S239D, A330L, I332E; IgG1-P247I, A339D или Q; IgG1-D280H, K290S с или без S298D или V; IgG1-F243L, R292P, Y300L; IgG1-F243L, R292P, Y300L, P396L; и IgG1-F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L; где нумерация остатков в Fc-области соответствует EU-индексу, описанному в публикации Кабата с соавт. (Kabat *et al.*, Sequences of proteins of Immunological Interest, 1991 Fifth edition).

[0234] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления Адаптер включает функциональный домен, который включает фрагмент антитела, который придает Адаптеру биологическую или биохимическую характеристику иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела придает характеристику, выбранную из следующих: способность к нековалентной димеризации, способность к локализации на участке опухоли и увеличенный полупериод существования в сыворотке по сравнению с Адаптером без фрагмента антитела. В некоторых вариантах осуществления Адаптер является, по меньшей мере, таким же стабильным, что и соответствующий фрагмент антитела без Адаптера. В некоторых вариантах осуществления Адаптер является более стабильным, чем соответствующий фрагмент антитела без Адаптера. Стабильность белка Адаптера может быть измерена с помощью известных методов, включающих, например, методы ИФА. В некоторых вариантах осуществления Адаптер является стабильным в цельной крови (*in vivo* или *ex vivo*) при 37°C в течение по меньшей мере приблизительно 10 часов, по меньшей мере приблизительно 15 часов, по меньшей мере приблизительно 20 часов, по меньшей мере приблизительно 24 часов, по меньшей мере приблизительно 25 часов, по меньшей мере приблизительно 30 часов, по меньшей мере приблизительно 35 часов, по меньшей мере приблизительно 40 часов, по меньшей мере приблизительно 45 часов, по меньшей мере приблизительно 48 часов, по меньшей мере приблизительно 50 часов, по меньшей мере приблизительно 55 часов, по меньшей мере приблизительно 60 часов, по меньшей мере приблизительно 65 часов, по меньшей мере приблизительно 70 часов, по меньшей мере приблизительно 72 часов, по меньшей мере приблизительно 75 часов, по меньшей мере приблизительно 80 часов, по меньшей мере приблизительно 85 часов, по меньшей мере приблизительно 90 часов, по меньшей мере приблизительно 95 часов или по меньшей мере приблизительно 100 часов (включая любое время между перечисленными значениями). В одном варианте осуществления Адаптер содержит эффекторный домен иммуноглобулина или домен, влияющий на полупериод

существования, который соответствует домену или фрагменту иммуноглобулина, в котором была изменена по меньшей мере часть одного или более доменов константной области для обеспечения требуемых биохимических характеристик, таких как повышенные или сниженные эффекторные функции, способность к нековалентной димеризации, повышенная способность к локализации на участке опухоли, уменьшенный полупериод существования в сыворотке или увеличенный полупериод существования в сыворотке по сравнению с фрагментом иммуноглобулина, имеющим соответствующую неизменную последовательность иммуноглобулина. Такие изменения доменов константной области могут быть аминокислотными заменами, вставками или делециями.

[0235] В одном варианте осуществления Адаптер включает функциональный домен, включающий аминокислотную последовательность эффекторного домена иммуноглобулина или производного эффекторного домена иммуноглобулина, которые придают антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) Адаптеру. В дополнительных вариантах осуществления Адаптер включает последовательность эффекторного домена иммуноглобулина, которая была модифицирована для увеличения ADCC (см., например, Bruhns, *Blood* 113: 3716-3725 (2009); Shields, *J. Biol. Chem.* 276: 6591-6604 (2001); Lazar, *PNAS* 103: 4005-4010 (2006); Stavenhagen, *Cancer Res.* 67: 8882-8890 (2007); Horton, *Cancer Res.* 68: 8049-8057 (2008); Zalevsky, *Blood* 113: 3735-3743 (2009); Bruckheimer, *Neoplasia* 11: 509-517 (2009); WO 06/020114; Strohl, *Curr. Op. Biotechnol.* 20: 685-691 (2009); и WO 04/074455, содержание которых полностью включено в настоящее описание путем ссылки). Примеры модификаций в инженерии фрагментов иммуноглобулина, содержащихся в аминокислотной последовательности в Адаптере, которые увеличивают ADCC, включают последовательности эффекторного домена иммуноглобулина, имеющие одну или более модификаций, соответствующих следующим: IgG1-S298A, E333A, K334A; IgG1-S239D, I332E; IgG1-S239D, A330L, I332E; IgG1-P247I, A339D или Q; IgG1-D280H, K290S с или без S298D или V; IgG1-F243L, R292P, Y300L; IgG1-F243L, R292P, Y300L, P396L; и IgG1-F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L; где нумерация остатков в Fc области соответствует нумерации EU-индекса, описанного в публикации Кабата с соавт. (Kabat *et al.*, *Sequences of proteins of Immunological Interest*, 1991 Fifth edition, включенной в настоящее описание путем ссылки).

[0236] В дополнительных вариантах осуществления Адаптер включает функциональный домен, включающий аминокислотную последовательность эффекторного домена иммуноглобулина или производного эффекторного домена иммуноглобулина, которые придают антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) Адаптеру. В дополнительных вариантах осуществления Адаптер включает последовательность эффекторного домена иммуноглобулина, модифицированную для увеличения антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) (см., например, Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276: 6591-6604 (2001); Lazar *et al.*, *PNAS* 103: 4005-4010 (2006); Stavenhagen *et al.*, *Cancer Res.* 67: 8882-8890 (2007); Richards *et al.*, *Mol. Cancer Ther.* 7: 2517-2527 (2008); Horton *et al.*, *Cancer Res.* 68: 8049-8057 (2008); Zalevsky *et al.*, *Blood* 113: 3735-3743 (2009);

Bruckheimer *et al.*, Neoplasia 11: 509-517 (2009); WO 06/020114; Strohl, Curr. Op. Biotechnol. 20: 685-691 (2009); и WO 04/074455, содержание которых полностью включено в настоящее описание путем ссылки). Примеры модификаций в инженерии фрагментов иммуноглобулина, содержащихся в аминокислотной последовательности в Адаптере, которые увеличивают ADCP, включают последовательности эффекторного домена иммуноглобулина, имеющие одну или более модификаций, соответствующих следующим: IgG1-S298A, E333A, K334A; IgG1-S239D, I332E; IgG1-S239D, A330L, I332E; IgG1-P247I, A339D или Q; IgG1-D280H, K290S с или без S298D или V; IgG1-F243L, R292P, Y300L; IgG1-F243L, R292P, Y300L, P396L; IgG1-F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L; и IgG1-G236A, S239D, I332E; где нумерация остатков соответствует EU-индексу, описанному в публикации Кабата с соавт. (Kabat *et al.*, Sequences of proteins of Immunological Interest, 1991 Fifth edition, включенной в настоящее описание путем ссылки).

[0237] В дополнительных вариантах осуществления Адаптер включает функциональный домен, включающий аминокислотную последовательность эффекторного домена иммуноглобулина или производного эффекторного домена иммуноглобулина, которые придают комплементзависимую цитотоксичность (CDC) Адаптеру. В дополнительных вариантах осуществления Адаптер включает последовательность эффекторного домена иммуноглобулина, которая была модифицирована для увеличения комплементзависимой цитотоксичности (CDC) (см., например, Idusogie *et al.*, J. Immunol. 166: 2571-2575 (2001); Strohl, Curr. Op. Biotechnol. 20: 685-691 (2009); и Natsume *et al.*, Cancer Res. 68: 3863-3872 (2008), содержание которых полностью включено в настоящее описание путем ссылки). В качестве примера, Адаптеры могут содержать фрагмент антитела или домен, содержащий одну или более следующих модификаций, которые увеличивают CDC: IgG1-K326A, E333A; IgG1-K326W, E333S, IgG2-E333S; где нумерация остатков соответствует EU-индексу, описанному в публикации Кабата с соавт. (Sequences of proteins of Immunological Interest, 1991 Fifth edition, включенной в настоящее описание путем ссылки).

[0238] В дополнительных вариантах осуществления Адаптер включает функциональный домен, включающий аминокислотную последовательность эффекторного домена иммуноглобулина или производного эффекторного домена иммуноглобулина, которые придают способность связывания рецептора Fc-гамма RIIb с Адаптером. В дополнительных вариантах осуществления Адаптер включает последовательность эффекторного домена иммуноглобулина, которая была модифицирована для увеличения ингибирующего связывания с Fc-гамма RIIb рецептором (см., например, Chu *et al.*, Mol. Immunol. 45: 3926-3933 (2008)). Примером модификации в инженерии фрагментов иммуноглобулина, содержащейся в аминокислотной последовательности в Адаптере, которая увеличивает связывание с ингибирующим Fc-гамма RIIb рецептором, является IgG1-S267E, L328F.

[0239] Биологический полупериод существования IgG опосредован его pH-зависимым связыванием с неонатальным FcRn рецептором. В некоторых вариантах

осуществления Адаптер содержит функциональный домен, включающий аминокислотную последовательность эффекторного домена иммуноглобулина или производного эффекторного домена иммуноглобулина, которые придают способность связывания неонатального рецептора FcRn с Адаптером. В некоторых вариантах осуществления Адаптер содержит функциональный домен, включающий последовательность FcRn-связывающего домена иммуноглобулина, который был модифицирован для улучшения связывания с FcRn (см., например, Petkova *et al.*, *Int. Immunol.* 18: 1759-1769 (2006); Dall'Acqua *et al.*, *J. Immunol.* 169: 5171-5180 (2002); Oganessian *et al.*, *Mol. Immunol.* 46: 1750-1755 (2009); Dall'Acqua *et al.*, *J. Biol. Chem.* 281: 23514-23524 (2006), Hinton *et al.*, *J. Immunol.* 176: 346-356 (2006); Datta-Mannan *et al.*, *Drug Metab. Dispos.* 35: 86-94 (2007); Datta-Mannan *et al.*, *J. Biol. Chem.* 282: 1709-1717 (2007); WO 06/130834; Strohl, *Curr. Op. Biotechnol.* 20: 685-691 (2009); и Yeung *et al.*, *J. Immunol.* 182: 7663-7671 (2009), содержание которых полностью включено в настоящее описание путем ссылки).

[0240] В дополнительных вариантах осуществления Адаптер включает функциональный домен, включающий последовательность эффекторного домена иммуноглобулина, которая была модифицирована, чтобы иметь селективную аффинность к FcRn при pH 6,0, но не при pH 7,4. В качестве примера, функциональный домен Адаптера может содержать фрагмент антитела или домен, содержащий одну или более следующих модификаций, которые увеличивают полупериод существования: IgG1-M252Y, S254T, T256E; IgG1-T250Q, M428L; IgG1-H433K, N434Y; IgG1-N434A; и IgG1-T307A, E380A, N434A; где нумерация остатков соответствует EU-индексу, описанному в публикации Кабата с соавт. (Kabat *et al.*, *Sequences of proteins of Immunological Interest*, 1991 Fifth edition, включенной в настоящее описание путем ссылки).

[0241] Согласно другому варианту осуществления, Адаптер включает функциональный домен, включающий аминокислотную последовательность, соответствующую эффекторному домену иммуноглобулина, которая была модифицирована, чтобы содержать по меньшей мере одну замену в ее последовательности, соответствующей положению в Fc-области (например, Fc гамма), выбранному из: 238, 239, 246, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 и 439, где нумерация остатков в Fc-области соответствует системе нумерации EU; согласно Kabat *et al.*, *Sequences of proteins of Immunological Interest*, 1991 Fifth edition, включенной в настоящее описание путем ссылки. В определенном варианте осуществления Адаптер содержит функциональный домен, включающий последовательность производного эффекторного домена иммуноглобулина, где по меньшей мере один остаток, соответствующий положению 434, является остатком, выбранным из: A, W, Y, F и H. Согласно другому варианту осуществления Адаптер включает последовательность производного эффекторного фрагмента иммуноглобулина, имеющую следующие соответствующие замены S298A/E333A/K334A. В дополнительном

варианте осуществления Адаптер включает производное эффекторного домена иммуноглобулина, имеющее замену, соответствующую K322A. В другом варианте осуществления Адаптер включает последовательность производного эффекторного домена иммуноглобулина, имеющую одну или любую комбинацию следующих замен K246N, N268D, E283L, S324G, S239D и I332E. Согласно еще одному варианту осуществления Адаптер включает последовательность производного эффекторного домена иммуноглобулина, имеющую замены, соответствующие D265A/N297A.

[0242] В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает функциональный домен, включающий последовательность эффекторного домена иммуноглобулина, который был подвергнут гликомодификации или мутации с целью увеличения эффекторной функции с помощью методов, известных в уровне техники. Например, деактивация (посредством точечных мутаций или других средств) последовательности домена константной области, содержащейся в Адаптере, может уменьшить связывание Fc-рецептором циркулирующего Адаптера, что увеличивает локализацию опухоли. В других случаях существует возможность, что модификации константной области, согласующиеся с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, будут уменьшать связывание компонента, и, таким образом, уменьшать полупериод существования в сыворотке и неспецифическую ассоциацию конъюгированного цитотоксина. Другие модификации константной области могут использоваться для изменения дисульфидных связей или олигосахаридных остатков, что обеспечит улучшенную локализацию вследствие повышенной антигенной специфичности или гибкости антитела. Получаемый в результате физиологический профиль, биодоступность и другие биохимические эффекты модификаций, такие как локализация опухоли, биораспределение и полупериод существования в сыворотке, могут быть легко измерены и определены количественно при использовании хорошо известных иммунологических методов без излишнего экспериментирования.

[0243] Получение Адаптера, полезного при практической реализации предложенных способов, может быть выполнено с использованием различных стандартных методов химического синтеза, полусинтетических методов и методик рекомбинантных ДНК, известных в уровне техники. В нескольких вариантах осуществления полная производственная схема получения Адаптера включает получение референсного белкового каркаса и идентификацию множества остатков в каркасе для модификации. В зависимости от варианта осуществления референсный каркас может включать белковую структуру с одной или более альфа-спиральными областями или другую третичную структуру. После идентификации, множество остатков может быть модифицировано, например, путем замены аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления замена является консервативной, тогда как в других вариантах осуществления делают неконсервативные замены. В некоторых вариантах осуществления природную аминокислоту (например, одну из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина,

фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина или валина) заменяют в референсном каркасе в намеченном положении для модификации. В некоторых вариантах осуществления модификации не включают замену цистеина или пролина. После того как модификации были сделаны во всех идентифицированных положениях, требуемых в конкретном варианте, полученные модифицированные полипептиды (например, кандидатный Адаптер) могут рекомбинантно экспрессироваться, например, в плазмидном, бактериальном, фаговом или другом векторе (например, для увеличения числа каждого из модифицированных полипептидов). Затем модифицированные полипептиды можно очищать и подвергать скринингу для идентификации тех модифицированных полипептидов, которые обладают специфичным связыванием с конкретной мишенью, представляющей интерес. В нескольких вариантах осуществления некоторые модифицированные полипептиды будут демонстрировать улучшенную специфичность связывания в отношении представляющей интерес мишени по сравнению с референсным каркасом, который в некоторых вариантах осуществления может демонстрировать минимальное связывание с данной мишенью, представляющий интерес. В дополнительных вариантах осуществления, в зависимости от представляющей интерес мишени, референсный каркас может демонстрировать некоторое взаимодействие (например, неспецифичное взаимодействие) с представляющей интерес мишенью, тогда как некоторые модифицированные полипептиды будут демонстрировать по меньшей мере приблизительно в два раза, по меньшей мере приблизительно в пять раз, по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по меньшей мере приблизительно в 20 раз, по меньшей мере приблизительно в 50 раз или по меньшей мере приблизительно в 100 раз (или больше) повышенную специфичность связывания в отношении представляющей интерес мишени. Необязательно референсная последовательность и/или модифицированные полипептиды (например, Адаптер) могут быть деиммунизированы. Например, остатки или мотивы, которые потенциально иммуногенными, могут быть идентифицированы и модифицированы с целью уменьшения или устранения потенциальных иммунных ответов против Адаптера. Дополнительная подробная информация относительно различных вариантов производства, отбора и выделения Адаптера более подробно предоставлена ниже.

Таблица 2 - Примеры р26 АФП-содержащих Адаптеров

SEQ ID NO:	Последовательность адаптера	Мишень
50	MGSWDEF SRRLYAIEWQLYAQGGTEAELAAFEKEIAAFESEL QAYKGEKSPEVEKLRRLAAVIRENLQAYRHNGGGGGDGGGGG SGGGSGQESQALAKRSCGLFQKLGEYYLQNAFLVAYTKKAP QLTSSSELMATRMAATAATCCQLSEDKLLACGEGAADIIGH LCIRHEMTPVNPVGVCCTSSYANRRPCFSSLVDETYVPPAF SDDKFIFHKDLCQAQGVVALQTMKQEFNLVQKQPITEEQLE AVIADFSGLLEKCCQGQEQEVCFAEEGQKLISKTRAALGV	CD123
51	MGSWDEFGRRLYAIESQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFESELQ AYKKGKNPEVEKLRRLAAVIRENLQAYRHNGGGGGDGGGGGS GGGSGQESQALAKRSCGLFQKLGEYYLQNAFLVAYTKKAPQ LTSSSELMATRMAATAATCCQLSEDKLLACGEGAADIIGHL	CD123

SEQ ID NO:	Последовательность адаптера	Мишень
	CIRHEMTPVNPVGVCCTSSYANRRPCFSSLVDETYVPPAFS DDKFIFHKDLCQAQGVALQTMKQEFLINLVKQKPQITEEQLEA VIADFSGLLEKCCQGQEQEVCFAEEGQKLISKTRAALGV	
52	MGSWDEFGRRLYAIEAQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFESELQ AYKKGKNPEVEKLREIAAVIRENLQAYRHNGGGGDGGGGGS GGGSGQESQALAKRSCGLFQKLGEYYLQNAFLVAYTKKAPQ LTSSELMAITRKMAATAATCCQLSEDKLLACGEGAADIIIHGL CIRHEMTPVNPVGVCCTSSYANRRPCFSSLVDETYVPPAFS DDKFIFHKDLCQAQGVALQTMKQEFLINLVKQKPQITEEQLEA VIADFSGLLEKCCQGQEQEVCFAEEGQKLISKTRAALGV	CD123
53	MGSWDEFGRRLYAIEEQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFESELQ AYKKGKNPEVEKLREIAAVIRENLQAYRHNGGGGDGGGGGS GGGSGQESQALAKRSCGLFQKLGEYYLQNAFLVAYTKKAPQ LTSSELMAITRKMAATAATCCQLSEDKLLACGEGAADIIIHGL CIRHEMTPVNPVGVCCTSSYANRRPCFSSLVDETYVPPAFS DDKFIFHKDLCQAQGVALQTMKQEFLINLVKQKPQITEEQLEA VIADFSGLLEKCCQGQEQEVCFAEEGQKLISKTRAALGV	CD123
54	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFESEL QAYKKGKSPEVEKLREIAAVIRENLQAYRHNGGGGDGGGGG SGGGSGQESQALAKRSCGLFQKLGEYYLQNAFLVAYTKKAP QLTSSELMAITRKMAATAATCCQLSEDKLLACGEGAADIIIHGL LCIRHEMTPVNPVGVCCTSSYANRRPCFSSLVDETYVPPAF SDDKFIFHKDLCQAQGVALQTMKQEFLINLVKQKPQITEEQLE AVIADFSGLLEKCCQGQEQEVCFAEEGQKLISKTRAALGV	CD123
55	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFESEL QAYKGEKSPEVEKLREIAAVIRENLQAYRHNGGGGDGGGGG SGGGSGQESQALAKRSCGLFQKLGEYYLQNAFLVAYTKKAP QLTSSELMAITRKMAATAATCCQLSEDKLLACGEGAADIIIHGL LCIRHEMTPVNPVGVCCTSSYANRRPCFSSLVDETYVPPAF SDDKFIFHKDLCQAQGVALQTMKQEFLINLVKQKPQITEEQLE AVIADFSGLLEKCCQGQEQEVCFAEEGQKLISKTRAALGV	CD123
56	MGSWDEFGRRLYAIESQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFESELQ AYKKGKNPEVEKLREIAAVIRENLQAYRHNGGGGDGGGGGS GGGSGQESQALAKRSCGLFQKLGEYYLQNAFLVAYTKKAPQ LTSSELMAITRKMAATAATCCQLSEDKLLACGEGAADIIIHGL CIRHEMTPVNPVGVCCTSSYANRRPCFSSLVDETYVPPAFS DDKFIFHKDLCQAQGVALQTMKQEFLINLVKQKPQITEEQLEA VIADFSGLLEKCCQGQEQEVCFAEEGQKLISKTRAALGVGGG GSGGGGSGGGGSGMGSWDEFGRRLYAIESQLYALGGTEAEL AAFEKEIAAFESELQAYKKGKNPEVEKLREIAAVIRENLQAYR HN	CD123
57	MGSWDEFGRRLYAIEAQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFESELQ AYKKGKNPEVEKLREIAAVIRENLQAYRHNGGGGDGGGGGS GGGSGQESQALAKRSCGLFQKLGEYYLQNAFLVAYTKKAPQ LTSSELMAITRKMAATAATCCQLSEDKLLACGEGAADIIIHGL CIRHEMTPVNPVGVCCTSSYANRRPCFSSLVDETYVPPAFS DDKFIFHKDLCQAQGVALQTMKQEFLINLVKQKPQITEEQLEA VIADFSGLLEKCCQGQEQEVCFAEEGQKLISKTRAALGVGGG GSGGGGSGGGGSGMGSWDEFGRRLYAIEAQLYALGGTEAEL AAFEKEIAAFESELQAYKKGKNPEVEKLREIAAVIRENLQAYR HN	CD123

SEQ ID NO:	Последовательность адаптера	Мишень
58	MGSWDEFGRRLYAIEEQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFESELQ AYKKGKNPEVEKLREIAAVIRENLQAYRHNGGGGGDGGGGGS GGGSGQESQALAKRSCGLFQKLGEYYLQNAFLVAYTKKAPQ LTSSSELMATRMAATAATCCQLSEDKLLACGEGAADIIIGHL CIRHEMTPVNPVGVCCTSSYANRRPCFSSLVVDETYVPPAFS DDKFIFHKDLCQAQGVVALQTMKQEFLINLVKQKPQITEEQLEA VIADFSGLLEKCCQGQEQEVCFAEEGQKLISKTRAALGVGGG GSGGGGSGGGGSGMGSWDEFGRRLYAIEEQLYALGGTEAEL AAFEKEIAAFESELQAYKKGKNPEVEKLREIAAVIRENLQAYR HN	CD123
59	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFESEL QAYKKGKSPEVEKLREIAAVIRENLQAYRHNGGGGGDGGGGG SGGGSGQESQALAKRSCGLFQKLGEYYLQNAFLVAYTKKAP QLTSSSELMATRMAATAATCCQLSEDKLLACGEGAADIIIGHL LCIRHEMTPVNPVGVCCTSSYANRRPCFSSLVVDETYVPPAF SDDKFIFHKDLCQAQGVVALQTMKQEFLINLVKQKPQITEEQLE AVIADFSGLLEKCCQGQEQEVCFAEEGQKLISKTRAALGVGG GGSGGGGSGGGGSGMGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGTEAE LAAFEKEIAAFESELQAYKKGKSPEVEKLREIAAVIRENLQAY RHN	CD123
60	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFESEL QAYKGEKSPEVEKLREIAAVIRENLQAYRHNGGGGGDGGGGG SGGGSGQESQALAKRSCGLFQKLGEYYLQNAFLVAYTKKAP QLTSSSELMATRMAATAATCCQLSEDKLLACGEGAADIIIGHL LCIRHEMTPVNPVGVCCTSSYANRRPCFSSLVVDETYVPPAF SDDKFIFHKDLCQAQGVVALQTMKQEFLINLVKQKPQITEEQLE AVIADFSGLLEKCCQGQEQEVCFAEEGQKLISKTRAALGVGG GGSGGGGSGGGGSGMGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGTEAE LAAFEKEIAAFESELQAYKGEKSPEVEKLREIAAVIRENLQAY RHN	CD123
61	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYAQGGTEAELAAFEKEIAAFESEL QAYKGEKSPEVEKLREIAAVIRENLQAYRHNGGGGGDGGGGG SGGGSGQESQALAKRSCGLFQKLGEYYLQNAFLVAYTKKAP QLTSSSELMATRMAATAATCCQLSEDKLLACGEGAADIIIGHL LCIRHEMTPVNPVGVCCTSSYANRRPCFSSLVVDETYVPPAF SDDKFIFHKDLCQAQGVVALQTMKQEFLINLVKQKPQITEEQLE AVIADFSGLLEKCCQGQEQEVCFAEEGQKLISKTRAALGVGG GGSGGGGSGGGGSGMGSWDEFGRRLYAIEWQLYAQGGTEAE LAAFEKEIAAFESELQAYKGEKSPEVEKLREIAAVIRENLQAY RHN	CD123
101	DEGGGGSMGSWAEFKQRLAAIKTRLEALGGSEAEAAFEKEI AAFESELQAYKKGKNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHNGGG GSGGGGSGGGGSGLEKCFQTENPLECQDKGEEELQKYIQESQ ALAKRSCGLFQKLGEYYLQNAFLVAYTKKAPQLTSSSELMATR RKMAATAATCCQLSEDKLLACGEGAADIIIGHL CIRHEMTPVNPVGVCCTSSYANRRPCFSSLVVDETYVPPAFSDDKFIFHKDL CQAQGVVALQTMKQEFLINLVKQKPQITEEQLEAVIADFSGLLE KCCQGQEQEVCFAEEGQKLISKTRAALGVGGGGSGGGGSGG GSMGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFE SELQAYKKGKNPEVEKLREIAAVIRENLQAYRHNGGGGGSGGG GSGGGGSHHHHHHHHHHH	CD123

SEQ ID NO:	Последовательность адаптера	Мишень
102	DEGGGGSMGSWAEFKQRLAAIKTRLEALGGSEAEAAFEKEI AAFESELQAYKKGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHNGGG GSGGGGSGGGGSGLEKCFQTENPLECQDKGEEELQKYIQESQ ALAKRSCGLFQKLGEYYLQNAFLVAYTKKAPQLTSSSELMAIT RKMAATAATCCQLSEDKLLACGEGAADIIIHGLCIRHEMTPVN PGVGQCCTSSYANRRPCFSSLVVDETYVPPAFSDDKFIFHKDL CQAQGVVALQTMKQEFNLINLVKQKPQITEEQLEAVIADFSGLLE KCCQGQEQEVCFAEEGQKLISKTRAALGVGGGGSGGGGSGG GGSMGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGTEAEAAFEKEIAAFE SELQAYKKGKGSPEVEKLREIAAVIRENLQAYRHNGGGGSGGG GSGGGGSHHHHHHHHHH	CD123
103	DEGGGGSMGSWAEFKQRLAAIKTRLEALGGSEAEAAFEKEI AAFESELQAYKKGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHNGGG GSGGGGSGGGGSGLEKCFQTENPLECQDKGEEELQKYIQESQ ALAKRSCGLFQKLGEYYLQNAFLVAYTKKAPQLTSSSELMAIT RKMAATAATCCQLSEDKLLACGEGAADIIIHGLCIRHEMTPVN PGVGQCCTSSYANRRPCFSSLVVDETYVPPAFSDDKFIFHKDL CQAQGVVALQTMKQEFNLINLVKQKPQITEEQLEAVIADFSGLLE KCCQGQEQEVCFAEEGQKLISKTRAALGVGGGGSGGGGSGG GGSMGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGTEAEAAFEKEIAAFE SELQAYKGEKSPEVEKLREIAAVIRENLQAYRHNGGGGSGGG GSGGGGSHHHHHHHHHH	CD123
104	DEMGSWDEFRRRLYAIEWQLYAQGGTEAEAAFEKEIAAFES ELQAYKGEKSPEVEKLRELA AVIRENLQAYRHNGGGGDDGGG GSGGGGSGQESQALAKRSCGLFQKLGEYYLQNAFLVAYTKK APQLTSSSELMAITRKMAATAATCCQLSEDKLLACGEGAADIII GHL CIRHEMTPVNPVGQCCTSSYANRRPCFSSLVVDETYVPP AFSDDKFIFHKDLCQAQGVVALQTMKQEFNLINLVKQKPQITEEQ LEAVIADFSGLLEKCCQGQEQEVCFAEEGQKLISKTRAALGVG GGGSGGGGSGGGGSHHHHHHHHHH	CD123

[0244] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к композициям, включающим один или более Адаптеров, раскрытых в Таблице 2. В других вариантах осуществления изобретение относится к композициям, включающим один или более Адаптеров, включающих последовательность, обладающую 60-70%, 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 95-99% гомологией (включая перекрывающиеся диапазоны между ними) с последовательностью, раскрытой в Таблице 2. В некоторых вариантах осуществления Адаптеры, обладающие такой гомологией, функционально подобны или идентичны по сравнению с соответствующей референсной последовательностью в Таблице 2. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к полипептиду, включающему один или более Адаптеров, которые конкурируют с (полностью или частично) одним или больше Адаптерами, раскрытыми в Таблице 2 (референсной последовательностью), за связывание CD123. Способность одного полипептида конкурировать с референсным полипептидом за связывание с соответствующей мишенью может быть обычно определена с помощью стандартного конкурентного анализа, известного в уровне техники. В некоторых вариантах осуществления конкуренция не требует, чтобы Адаптер конкурировал за тот же эпитоп, что и Адаптеры в Таблице 2, а скорее полипептид может

конкурировать при связывании стерически ингибирующего эпитопа, перекрывающегося эпитопа *и т.д.*

С. Химерные антигенные рецепторы

[0245] Также изобретение относится к химерным антигенным рецепторам (CAR), включающим внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления CAR, раскрытый в настоящем изобретении, включает внеклеточный домен, включающий Антигенную детерминанту (AD). В некоторых вариантах осуществления CAR, раскрытый в настоящем изобретении, включает внеклеточный домен, включающий по меньшей мере один D-домен (DD), раскрытый в настоящем изобретении, для придания специфичности связывания. В некоторых вариантах осуществления CAR, раскрытый в настоящем изобретении, включает внеклеточный домен, включающий ADBD. CAR-рецепторы могут экспрессироваться любым типом клеток.

[0246] В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор (CAR), раскрытый в настоящем изобретении, включает D-домен, который связывается с CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления CAR включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62-66 или 67. В некоторых вариантах осуществления CAR включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67.

[0247] В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор (CAR), раскрытый в настоящем изобретении, включает домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с AD p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления ADBD, который связывается с AD p26 АФП, включает scFv, который связывается с AD p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления ADBD, который связывается с AD p26 АФП, включает D-домен, который связывается с AD p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-43 и 44. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления DD, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В некоторых вариантах осуществления DD, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70-73 или 92-94.

В некоторых вариантах осуществления DD, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73. В некоторых вариантах осуществления CAR включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления CAR включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69.

[0248] В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор (CAR), раскрытый в настоящем изобретении, включает антигенную детерминанту (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-43 и 44. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

[0249] В некоторых вариантах осуществления CAR, раскрытый в настоящем изобретении, включает внеклеточный домен, включающий Антигенную детерминанту (AD). Такие CAR-рецепторы могут экспрессироваться на поверхности клеток (например, иммунной клетки или иммунной эффекторной клетки) и использоваться в комбинации с Адаптерами, включающими первый ADBD (например, D-домен), который связывает AD, и второй ADBD (например, D-домен), который связывает мишень на клетке-мишени, например, для уничтожения клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления AD включает АФП или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления AD включает p26 или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления AD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37-43 или 44. В некоторых вариантах осуществления AD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления AD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

[0250] В некоторых вариантах осуществления CAR, раскрытый в настоящем изобретении, включает внеклеточный домен, включающий по меньшей мере один D-домен (DD). В некоторых вариантах осуществления D-домен может распознавать Антигенную детерминанту (AD) (например, CD123) на клетке-мишени или AD (например, p26), которую включает Адаптер. В некоторых вариантах осуществления CAR-рецепторы, включающие DD, способный связывать AD на клетке-мишени, могут экспрессироваться на поверхности клеток (например, иммунной клетки или иммунной эффекторной клетки) и использоваться, например, для уничтожения клетки-мишени, экспрессирующей AD. В некоторых вариантах осуществления CAR, раскрытый в настоящем изобретении, включает внеклеточный домен, включающий по меньшей мере один CD123-связывающий D-домен, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий DD включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий DD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах

осуществления CAR-рецепторы, включающие DD, способный связывать первую AD (например, p26), могут экспрессироваться на поверхности клеток (например, иммунной клетки или иммунной эффекторной клетки) и использоваться в комбинации с Адаптером, включающим первую AD, и ADBD (например, D-домен), который связывает вторую AD на клетке-мишени, например, для уничтожения клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления CAR, раскрытый в настоящем изобретении, включает внеклеточный домен, включающий по меньшей мере один p26-связывающий D-домен, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В некоторых вариантах осуществления CAR, раскрытый в настоящем изобретении, включает внеклеточный домен, включающий по меньшей мере один p26-связывающий D-домен, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 70-73 и 92-94. В некоторых вариантах осуществления p26-связывающий DD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73. В некоторых вариантах осуществления p26 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37-43 или 44. В некоторых вариантах осуществления p26 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления p26 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

[0251] В некоторых вариантах осуществления CAR, раскрытый в настоящем изобретении, включает внеклеточный домен, включающий ADBD. В нескольких вариантах осуществления ADBD состоит, по меньшей мере частично, из мишень-связывающего полипептида (например, D-домена), раскрытого в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления ADBD может распознавать Антигенную детерминанту (AD) (например, CD123) на клетке-мишени или AD (например, p26), которую включает Адаптер. В некоторых вариантах осуществления CAR-рецепторы, включающие ADBD, способный связывать AD на клетке-мишени, могут экспрессироваться на поверхности клеток (например, иммунной клетки или иммунной эффекторной клетки) и использоваться, например, для уничтожения клетки-мишени, экспрессирующей AD. В некоторых вариантах осуществления CAR-рецепторы, включающие первый ADBD, способный связывать первую AD (например, p26), могут экспрессироваться на поверхности клеток (например, иммунной клетки или иммунной эффекторной клетки) и использоваться в комбинации с Адаптером, включающим первую AD и второй ADBD (например, D-домен), который связывает вторую AD на клетке-мишени, например, для уничтожения клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления p26 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37-43 или 44. В некоторых вариантах осуществления p26 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления p26 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

[0252] В настоящем изобретении также предложено средство для создания клеточно-ассоциированного DDpp, состоящего по меньшей мере из одного DDpp, сконструированного для придания специфичности связывания мембраносвязанному слитому белку. DDpp-рецепторы могут экспрессироваться любым типом клеток. В одном

варианте осуществления слитый белок DDpp-рецептор включает химерный антигенный рецептор (CAR) или DDpp-CAR, включающий: внеклеточный направляющий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен. В другом варианте осуществления DDpp-CAR состоит из внеклеточного направляющего домена, трансмембранного домена и цитоплазматического домена, где цитоплазматический домен включает сигнальный домен. В другом варианте осуществления DDpp-CAR внеклеточный домен включает один или более DDpp, где каждый DDpp составляет специфичный связывающий домен с одинаковыми или разными специфичностями. В некоторых вариантах осуществления мишень-специфичный домен направлен на один (или больше) раковых или опухолевых антигенов, раскрытых в настоящем изобретении, таких как BCMA, CD123 и CS1, в качестве неограничивающих примеров. В некоторых вариантах осуществления мишень-специфичный домен направлен на p26 АФП.

[0253] В нескольких вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен или его фрагмент выбран из следующей группы: человеческий домен CD3 дзета, домен 41BB, домен CD28 и любая их комбинация. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 115, 116 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 117. В зависимости от варианта осуществления костимулирующая сигнальная область включает внутриклеточный домен костимулирующей молекулы, выбранной из группы: CD27, CD28, 41BB, OX40, CD30, CD40, PD1, лимфоцитарного функционально-ассоциированного антигена 1 (LFA1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7H3, лиганда, который специфично связывается с CD83, и их любой комбинации.

[0254] В нескольких вариантах осуществления CAR включает слитый белок, включающий дополнительный мишень-связывающий полипептид.

[0255] В некоторых вариантах осуществления ADBD в CAR включает по меньшей мере один связывающий домен с альтернативным каркасом (например, D-домен или аффитело) разработанный, чтобы передать специфичность связывания мембраносвязанному CAR. Рецептор, включающий связывающий домен с альтернативным каркасом, может экспрессироваться любым типом клеток.

[0256] В одном варианте осуществления CAR состоит из следующих элементов: внеклеточный домен, трансмембранный домен и цитоплазматический домен, где цитоплазматический домен включают сигнальный домен. В другом варианте осуществления CAR состоит из внеклеточного домена и трансмембранного домена. В другом варианте осуществления CAR состоит из внеклеточного домена, состоящего из одного или более ADBD (например, D-домена) с одинаковой или разной специфичностью. В одном варианте осуществления внутриклеточный домен (например, цитоплазматический домен) CAR-рецептора включает внутриклеточный домен дзета-цепи CD3. В другом варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR состоит из части внутриклеточного домена дзета-цепи CD3. В другом варианте осуществления

внутриклеточный домен CAR включает внутриклеточный домен дзета-цепи CD3 и костимулирующей сигнальной области. Костимулирующая сигнальная область относится к части CAR, включающей весь или часть внутриклеточного домена костимулирующей молекулы. Костимулирующие молекулы и части этих молекул, которые способны придавать костимулирующие свойства CAR-рецептору, известны в уровне техники и могут обычно входить в CAR. Кроме того, усечения или мутация в этих внутриклеточных сигнальных и костимулирующих доменах могут быть включены для дополнительного улучшения или уменьшения сигнализации рецептора. В предпочтительных вариантах осуществления Т-клетка генетически модифицирована для стабильной экспрессии CAR. В таких вариантах осуществления может быть сконструирован цитоплазматический домен CAR, включающий CD28 и/или 41BB сигнальный домен, отдельно или в комбинации с любым другим требуемым цитоплазматическим доменом(ами), полезным в контексте изобретения. В одном варианте осуществления цитоплазматический домен CAR может быть сконструирован, чтобы дополнительно включать сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления цитоплазматический домен содержит последовательность SEQ ID NO: 115, 116 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления цитоплазматический домен содержит последовательность SEQ ID NO: 117. В одном варианте осуществления CAR включает внеклеточный домен, внеклеточный белковый линкер с трансмембранным доменом, который проходит через клеточную мембрану (такой, как обнаруженный в Т-клетках или НК-клетках), и цитоплазматический домен, необязательно включающий различные сигнальные модули. В нескольких вариантах осуществления CAR также может включать эпитопную метку. В нескольких вариантах осуществления цитоплазматический домен CAR может включать, без ограничения этим, сигнальные модули CD3-дзета, 41BB и CD28 и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления цитоплазматический домен содержит последовательность SEQ ID NO: 115, 116 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления цитоплазматический домен содержит последовательность SEQ ID NO: 117.

[0257] Изобретение также относится к выделенным последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим CAR-рецепторы, которые включают мишень-связывающие полипептиды в качестве части (или всей) направляющей области.

[0258] В некоторых вариантах осуществления направляющий домен CAR-рецептора включает множество связывающих доменов (например, DD или один или более DD и scFv), которые включают дополнительный мишень-связывающий полипептид.

[0259] В изобретении изобретение также относится к клеткам, включающим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR, где CAR включает антигенсвязывающий домен, состоящий, по меньшей мере частично, из раскрытого DDpp, который связывает представляющую интерес мишень (например, CD123 и p26 АФП), трансмембранного домена и сигнального домена. В некоторых вариантах осуществления CAR специфично связывается с опухолевым антигеном (и функционирует таким образом, доставляя клетку, экспрессирующую CAR, к опухоли. В некоторых вариантах

осуществления опухолевой антиген ассоциирован с гематологической злокачественной опухолью. В некоторых вариантах осуществления опухолевым антигеном является CD123. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является Т-клеткой, естественным киллером (NK-клетка) или иммунной клеткой другого типа. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR (Т-клетка, NK-клетка или клетка другого типа), демонстрирует противоопухолевый иммунитет при связывании полипептида со своим соответствующим опухолевым антигеном.

i. Внеклеточный домен

[0260] CAR-рецепторы, раскрытые в настоящем изобретении, включают один или более связывающих антигенные детерминанты доменов (ADBD) (например, D-доменов). ADBD в CAR может быть любым ADBD (например, D-доменом), описанным в настоящем изобретении. Пример ADBD включает полипептид, например, молекулу антитела (которая включает антитело и его антигенсвязывающие фрагменты, например, иммуноглобулин, однодоменное антитело (sdAb) и scFv), или неиммуноглобулиновый каркас (например, D-домен или аффитело).

[0261] В зависимости от требуемого антигена(ов), который будет служить мишенью, внеклеточный домен CAR может быть сконструирован так, чтобы он включал один или более доменов, связывающих антигенные детерминанты (ADBD), которые специфично связывают требуемый антиген-мишень (мишени). Например, в одном варианте осуществления CAR сконструирован для направленного взаимодействия с CD123, при этом CD123-связывающий ADBD (например, D-домен) включен во внеклеточный домен CAR. В альтернативе внеклеточный домен CAR может включать больше одного ADBD, что придает CAR мультиспецифичность или мультивалентность.

[0262] Выбор доменов ADBD во внеклеточном домене CAR зависит от идентичности клетки или клеток, которые будут являться мишенями. Например, внеклеточный домен CAR может быть сконструирован для специфичного связывания с поверхностными белками клеток, такими как рецептор, на такой же клетке или другой клетке. В других вариантах осуществления внеклеточный домен CAR сконструирован для специфичного связывания с растворимой молекулой, такой как иммуноглобулин.

[0263] В других вариантах осуществления внеклеточный домен CAR содержит один или более ADBD (например, D-домен), которые связывают лиганд, действующие в качестве маркера клеточной поверхности на клетках-мишенях, ассоциированных с раком. В некоторых вариантах осуществления ADBD направленно взаимодействуют и связываются с опухолевым или раковым антигеном (например, TAA, TSA, CAA, CSA или другим опухолевым антигеном, описанным в настоящем изобретении или иным образом известным в уровне техники). Таким образом, изобретение относится к способам получения CAR, к их применению в получении химерных клеток, таких как человеческие Т-клетки и NK-клетки, и к применению таких химерных Т и NK-клеток в адоптивной иммунотерапии.

[0264] Выбор ADBD (например, D-домена) может зависеть от типа и количества лигандов или рецепторов, которые определяют поверхность клетки-мишени. Например,

ADBD может быть выбран так, чтобы он распознавал лиганд или рецептор, который действует в качестве маркера клеточной поверхности на клетках-мишенях, ассоциированных с конкретным патологическим состоянием. Примеры маркеров клеточной поверхности, которые могут действовать в качестве лигандов или рецепторов, включают маркер клеточной поверхности, ассоциированный с конкретным патологическим состоянием, например, маркеры клеточной поверхности при вирусных заболеваниях, бактериальных заболеваниях, паразитарных инфекциях, аутоиммунных заболеваниях и нарушениях, связанных с нежелательной пролиферацией клеток, например, при раке, таком как рак, описанный в настоящем изобретении.

[0265] В некоторых вариантах осуществления ADBD связывается с CD123 (например, полипептидом, включающим последовательность SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления ADBD включает последовательность DD, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления CD123-специфичный DD включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления CD123-специфичный DD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

[0266] В некоторых вариантах осуществления ADBD (например, D-домен) связывается с АФП (например, полипептидом, включающим последовательность SEQ ID NO: 36) или его фрагментом. В некоторых вариантах осуществления ADBD (например, D-домен) связывается с р26 АФП (например, полипептидом, включающим последовательность SEQ ID NO: 37-43 или 44). В некоторых вариантах осуществления ADBD (например, D-домен) связывается с полипептидом, включающим последовательность SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления ADBD включает последовательность DD, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В некоторых вариантах осуществления DD связывает р26 АФП и включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70-73 или 92-94. В некоторых вариантах осуществления DD связывает р26 АФП и включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73.

[0267] В некоторых вариантах осуществления CAR включает ADBD, который представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления CAR включает ADBD, который представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления CAR включает ADBD, который представляет собой связывающий домен с альтернативным каркасом. В некоторых вариантах осуществления CAR включает ADBD, который представляет собой D-домен. В некоторых вариантах осуществления CAR включает T-клеточный рецептор или его антигенсвязывающий фрагмент.

[0268] Также изобретение относится к CAR, где CAR включает множество ADBD. В некоторых вариантах осуществления CAR включает множество одинаковых ADBD. В некоторых вариантах осуществления CAR включает множество разных ADBD. В некоторых вариантах осуществления CAR включает множество ADBD, которые связывают

одну и ту же антигенную детерминанту. В некоторых вариантах осуществления CAR включает множество ADBD, где связывающие домены связываются с разными AD. В некоторых вариантах осуществления CAR включает множество ADBD, где связывающие домены связываются с разными AD на одной и той же клетке. В некоторых вариантах осуществления CAR включает множество ADBD, где связывающие домены связываются с разными AD на разных клетках.

[0269] В некоторых вариантах осуществления CAR включает множество, например 2, 3, 4, 5 или больше 5, ADBD (например, D-доменов, аффител или scFv), где каждый ADBD способен связываться с антигеном-мишенью. В одном варианте осуществления два или более ADBD в CAR могут связываться с разными AD. В дополнительном варианте осуществления два или более ADBD в CAR могут связываться с одним и тем же антигеном, например, одинаковыми или разными эпитопами на одном и том же антигене. В одном варианте осуществления множество ADBD в CAR связаны друг с другом, например, С-конец первого ADBD связан с N-концом второго ADBD. В варианте осуществления С-конец первого ADBD связан с N-концом второго ADBD ковалентной связью, например, пептидной связью.

[0270] В некоторых вариантах осуществления, линкер или шарнирная область содержится между одним или больше ADBD, например, линкер или шарнирная область расположены между С-концом первого ADBD и N-концом второго ADBD. В качестве примера, антигенсвязывающий компонент, включающий два ADBD (например, ADBD₁ и ADBD₂), может иметь следующую конфигурацию: [ADBD₁]-[линкер/шарнир]-[ADBD₂] Дополнительные ADBD могут быть добавлены аналогичным образом, необязательно с линкером или шарнирными областями, расположенными между С-концом ADBD и N-концом следующего ADBD. Линкеры или шарнирные области, подходящие для применения при соединении множества антигенсвязывающих компонентов, являются гибкими, нерасщепляемыми и обеспечивают почти свободное движение каждого ADBD независимо от других ADBD, что способствует связыванию с множеством AD-мишеней одновременно. Может использоваться любой гибкий линкер или шарнирная область, известные в уровне техники. Примеры линкеров включают пептидные линкеры, включающие остатки глицина и серина, например, (GGGS)_n, где n является положительным целым числом, равным или больше 1, например, n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 (SEQ ID NO: 96). В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит последовательность SEQ ID NO: 45-48, 118 или 119. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит последовательность SEQ ID NO: 45-48, 118 или 119.

[0271] В некоторых вариантах осуществления CAR включает CD123-связывающий DD. В некоторых вариантах осуществления CAR включает ВСМА-связывающий DD и CD123-связывающий DD.

[0272] В некоторых вариантах осуществления часть антигенсвязывающего фрагмента CAR специфично связывает CD123 и CD33. В некоторых вариантах осуществления часть антигенсвязывающего фрагмента CAR специфично связывает CD123

и LeY. В дополнительных вариантах осуществления часть антигенсвязывающего фрагмента CAR дополнительно связывает мишень, выбранную из: BCMA, CS1, HVEM, BTLA, DR3, CD19, CD20 и CD22.

[0273] В некоторых вариантах осуществления часть антигенсвязывающего фрагмента CAR дополнительно связывает опухолевый антиген. В дополнительных вариантах осуществления часть антигенсвязывающего фрагмента CAR дополнительно связывает CD33 или LeY. В дополнительных вариантах осуществления часть антигенсвязывающего фрагмента CAR дополнительно связывает мишень, выбранную из: BCMA, CD123, CS1, HER2, HVEM, BTLA, DR3, CD19, CD20 и CD22.

[0274] В некоторых вариантах осуществления CAR включает 2, 3, 4, 5 или больше 5 DD и/или другие связывающие домены (например, scFv), которые специфично связывают представляющую интерес мишень (например, CD123), экспрессируемую на поверхности раковой клетки. В дополнительных вариантах осуществления CAR включает 2, 3, 4, 5 или больше 5 DD или другие связывающие домены (например, scFv), которые специфично связывают вторую, другую представляющую интерес мишень, экспрессируемую на поверхности раковой клетки. В дополнительных вариантах осуществления вводимый CAR дополнительно включает 2, 3, 4, 5 или больше 5 DD или другие связывающие домены (например, scFv), которые специфично связывают вторую, другую представляющую интерес мишень, экспрессируемую второй, другой раковой клеткой или клеткой эндотелия сосудов. В некоторых вариантах осуществления CAR включает 2, 3, 4, 5 или больше 5 DD и/или другие связывающие домены (например, scFv), которые специфично связывают p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления CAR включает 2, 3, 4, 5 или больше 5 DD и/или другие связывающие домены (например, scFv), которые специфично связывают CD123. В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий DD включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающий DD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

ii. Внеклеточный спейсерный домен

[0275] В некоторых вариантах осуществления CAR-рецепторы включают внеклеточный спейсерный домен. При использовании в настоящем изобретении термин "внеклеточный спейсерный домен" или "ESD" относится к полипептидной последовательности CAR, расположенной между ADBD и трансмембранным доменом. В варианте осуществления внеклеточный спейсерный домен обеспечивает достаточное расстояние от внешней поверхности клетки и ADBD, а также гибкость для сведения к минимуму стерических препятствий между клеткой и ADBD.

[0276] В конкретных вариантах осуществления внеклеточный спейсерный домен является достаточно коротким или гибким, чтобы он не препятствовал взаимодействию клетки, включающей CAR, с клеткой, несущей AD, например, клеткой-мишенью. В варианте осуществления внеклеточный спейсерный домен имеет длину 2-20, 5-15, 7-12 или 8-10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления домен ESD включает по меньшей

мере 50, 20 или 10 остатков. В некоторых вариантах осуществления ESD имеет длину 10-300, 10-250 или 10-200 остатков.

[0277] В некоторых вариантах осуществления расстояние, на которое ESD отходит от клетки, достаточно мало, поэтому шарнир не препятствует взаимодействию CAR ADBD с поверхностью клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления ESD отходит от поверхности цитотоксической клетки меньше чем на 20, 15 или 10 нанометров. Таким образом, пригодность для ESD может влиять как линейная длина, количество аминокислотных остатков, так и гибкость ESD. Например, длина ESD IgG4 может достигать 200 аминокислот, но при этом расстояние, на которое он отходит от поверхности цитотоксической клетки, будет меньше из-за сворачивания домена Ig. Длина ESD CD8 альфа, который имеет длину ~43 аминокислоты, составляет ~8 нм. Для сравнения, ESD C2 и C3 IgG4 имеет длину ~200 аминокислот, но расстояние от поверхности цитотоксических клеток сравнимо с расстоянием для ESD CD8 альфа. Без ограничения теорией, на сходство по длине влияет гибкость.

[0278] В некоторых вариантах осуществления внеклеточные спейсерные домены включают, без ограничения, Fc-фрагменты антител или их фрагменты или производные, шарнирные области антител или их фрагменты или производные, CH2-области антител, CH3-области антител, искусственные спейсерные последовательности или их комбинации. Дополнительные примеры внеклеточных спейсерных доменов включают, без ограничения, шарнир CD8a и искусственные спейсеры, полученные из полипептидов, которые могут быть не больше, чем, например, Gly3 или домены CH1 и CH3 IgG (такого как IgG4 человека). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный спейсерный домен представляет собой любой один или более из следующих: (i) шарнирная область, области CH2 и CH3 IgG4, (ii) шарнирная область IgG4, (iii) шарнирная область и CH2 IgG4, (iv) шарнирная область CD8a, (v) шарнирная область, области CH2 и CH3 IgG1, (vi) шарнирная область IgG1 или (vii) шарнирная область и область CH2 IgG1. Другие внеклеточные спейсерные домены будут очевидны специалистам в данной области и могут использоваться в рамках альтернативных вариантов осуществления, представленными в настоящем изобретении.

[0279] В некоторых вариантах осуществления ESD представляет собой природную последовательность. В некоторых вариантах осуществления ESD CAR соответствует ESD человеческого белка, его фрагмента или короткого олиго- или полипептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления CAR ESD соответствует ESD (шарнирной области) человеческого Ig (иммуноглобулина) или его фрагменту. В одном варианте осуществления ESD включает (например, состоит из) аминокислотную последовательность ESD IgG4. Например, в одном варианте шарнирная область включает (например, состоит из) аминокислотную последовательность шарнирной области IgD. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область может быть шарнирной областью CD8 человека или ее фрагментом. Например, в одном варианте осуществления шарнирная область включает (например, состоит из) аминокислотную последовательность шарнирной области CD8.

[0280] В некоторых вариантах осуществления ESD является искусственной последовательностью. В одном варианте осуществления ESD является коротким олигопептидным линкером, включающим глицин-сериновый дублет.

[0281] В некоторых вариантах осуществления CAR включает внеклеточный спейсерный домен CD8a.

[0282] В некоторых вариантах осуществления CAR не содержит внеклеточный спейсерный домен.

iii. Трансмембранный домен

[0283] Термин "трансмембранный домен" (TMD) при использовании в настоящем изобретении относится к области белка, экспрессируемого на клеточной поверхности, такого как CAR, который тянется через цитоплазматическую мембрану. В некоторых вариантах осуществления TMD соединяет внеклеточную последовательность (например, внеклеточный ADBD или внеклеточную AD) и внутриклеточную последовательность, такую как внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CAR является трансмембранной областью трансмембранного белка (например, трансмембранных белков I типа), искусственной гидрофобной последовательностью или их комбинацией. Другие трансмембранные домены будут известны специалистам в данной области и могут использоваться в рамках альтернативных вариантов осуществления изобретения. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный ADBD представляет собой CD123-связывающий ADBD (например, D-домен). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный ADBD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO 8, 13, 14, 31, 32 или 33. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный ADBD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO 14. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный ADBD представляет собой p26-связывающий ADBD (например, D-домен). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный ADBD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70-73 или 92-94. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный ADBD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO 73. В некоторых вариантах осуществления внеклеточная AD включает p26. В некоторых вариантах осуществления внеклеточная AD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO 37-43 или 44.

[0284] Может быть сконструирован CAR, содержащий трансмембранный домен, который слит с внеклеточным доменом рецептора. Как описано выше, слияние внеклеточных и трансмембранных доменов может быть выполнено с использованием линкера или без него. В одном варианте осуществления используется трансмембранный домен, который естественным образом связан с одним из доменов CAR. В конкретном варианте осуществления трансмембранный домен в CAR представляет собой трансмембранный домен CD8a. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CD8a включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CD8a включает аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 114. В некоторых случаях трансмембранный домен CAR включает шарнирный домен CD8a. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен CD8a, также называемый внеклеточным спейсерным доменом (ESD), включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен выбран или модифицирован путем аминокислотной замены для стимуляции или ингибирования ассоциации с другими поверхностными мембранными белками.

[0285] Трансмембранный домен может быть получен из природного или синтетического источника. Если источник является природным, домен может быть получен из любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. Трансмембранные области для конкретного применения в рамках настоящего документа могут происходить из (т.е. включать, по меньшей мере, трансмембранную область(и)) элемента, выбранного из группы: альфа, бета или дзета-цепь Т-клеточного рецептора; CD28, CD3 эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8a, CD8b, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и CD154. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен происходит из трансмембранной области(ей) NKR. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен происходит из трансмембранной области CD8a. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CD8a включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CD8a включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114. В других вариантах осуществления трансмембранный домен происходит из трансмембранной области молекулы, выбранной из группы, состоящей из: KIRDS2, OX40, TNFR2, LFA1 (CD11a, CD18), ICOS, 41BB, GITR, LTBR, BAFFR, HVEM, NKp80 (KLRF1), IL2R бета, IL2R гамма, IL7R α , ITGA1, ITGA4, ITGA6, ITGAD, ITGAE, ITGAL, ITGAM, ITGB7, VLA1, VLA6, IA4, ITGAX, CD11c, ITGB1 CD27, CD29, ITGB2, CD2, CD11a, CD11b, CD11d, CD18, CD19, CD40, CD49a, CD49d, CD49f, CD84, CD96, CD100, CD103, CD160, CD162, CD226, CD229, CEACAM1, CRTAM, PSGL1, SLAM (SLAMF1), SLAMF4, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAMF7, SLAMF8, SELPLG и PAG/Cbp. Также трансмембранный домен может быть синтетическим и предпочтительно преимущественно включает гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В других вариантах осуществления трансмембранный домен включает триплет FWV (фенилаланин, триптофан и валин) на каждом конце трансмембранного домена.

[0286] Иллюстративные домены NKR, например, трансмембранный, шарнирный или стебеля или внутриклеточный (например, цитоплазматический) домены (идентифицированные в NKR, из которого происходит домен) иммуноглобулиноподобных рецепторов KIR2DL1 (KIR) Естественных киллеров включают: KIR2DL2/L3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DL1/S1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR2DP1, KIR2DP1, NCR: NKp30, NKp44, NKp46, SLAM; рецепторы SLAM, CD48, CD229, 2B4, CD84, NTB-A, CRACC, BLAME, CD2F-10, SLAMF6, SLAMF7; Fc-связывающее рецепторы CD16, Fc γ RIII, CD64, Ly49; рецепторы Ly49, лектин-

подобный NK-клеточный рецептор Ly49A, Ly49C; другие NK-клеточные рецепторы NKG2D, CD160 (TM, содержащий вариант(ы) сплайсинга) DNAM1, CRTAM, CD27, PSLG1, CD96, CD100, NKp80, CEACAM1 и CD244.

vii. Внутриклеточный Сигнальный Домен

[0287] В настоящем изобретении описаны внутриклеточные сигнальные домены, которые могут использоваться в химерном антигенном рецепторе (CAR) согласно настоящему изобретению.

[0288] "Внутриклеточный сигнальный домен" (ISD) или "цитоплазматический домен" при использовании в настоящем изобретении относятся к части CAR, которая преобразует сигнал эффекторной функции и направляет клетку для выполнения своей специализированной функции (например, цитолитической активности и хелперной активности, включая секрецию цитокинов).

[0289] Цитоплазматический домен (т.е. внутриклеточный сигнальный домен) CAR отвечает за активацию по меньшей мере одной из нормальных эффекторных функций иммунной клетки, модифицированной для экспрессии CAR. Термин "эффекторная функция" относится к специализированной функции клетки. Эффекторная функция Т-клетки, например, включает цитолитическую активность и хелперную активность, включая секрецию цитокинов. Таким образом, термин "внутриклеточный сигнальный домен" относится к части белка CAR, которая преобразует сигнал эффекторной функции и направляет клетку для выполнения специализированной функции. Хотя обычно может использоваться весь внутриклеточный сигнальный домен, соответствующий природному рецептору, во многих случаях нет необходимости использовать всю цепь. В случае, если используется усеченная часть внутриклеточного сигнального домена, такая усеченная часть может использоваться вместо интактной цепи при условии, что она преобразует сигнал эффекторной функции. Термин внутриклеточный сигнальный домен, таким образом, подразумевает включение любой усеченной части внутриклеточного сигнального домена, достаточной для трансдукции сигнала эффекторной функции. В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен в CAR включает цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора (TCR), а также последовательность корецепторов, которые действуют совместно для инициации сигнальной трансдукции после связывания антигенного рецептора, или любое производное или вариант таких последовательностей, который обладает функциональной способностью. Примеры доменов, которые преобразуют сигнал эффекторной функции, включают, без ограничения, ζ-цепь комплекса Т-клеточного рецептора или любой из ее гомологов (например, η-цепь, FcεR1γ и β-цепи, MB 1 (Iga) цепь, B29 (Ig) цепь и т.д.), дзета-цепь CD3 человека, полипептиды CD3 (Δ, δ и ε), тирозинкиназы семейства syk (Syk, ZAP 70 и т.д.), тирозинкиназы семейства src (Lck, Fyn, Lyn и т.д.) и другие молекулы, участвующие в Т-клеточной трансдукции, такие как CD2, CD5 и CD28.

[0290] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR генерирует внутриклеточный сигнал при связывании внеклеточного домена

(например, ADBD), с которым он слит, с когнатной AD. Внутриклеточные сигнальные домены CAR могут включать основные внутриклеточные сигнальные домены и костимулирующие сигнальные домены. В одном варианте осуществления CAR сконструирован для экспрессии в иммунной клетке (например, Т- или НК-клетке), причем экспрессируемый CAR включает домен, такой как основной внутриклеточный сигнальный домен и/или костимулирующий сигнальный домен, полученный из полипептида, как правило, ассоциированного с иммунной клеткой. Например, в некоторых вариантах осуществления CAR предназначен для экспрессии в Т-клетке и включает домен 41BB и домен CD3 дзета. В другом варианте осуществления молекула CAR сконструирована для экспрессии в иммунной клетке, причем экспрессируемый CAR включает домен, полученный из полипептида, который, как правило, не ассоциирован с иммунной клеткой. Например, в некоторых вариантах осуществления CAR для экспрессии в Т-клетке включает домен KIR, происходящий из НК-клетки. В альтернативном варианте осуществления CAR для экспрессии в НК-клетке включает домен 41BB и домен CD3 дзета, происходящий из Т-клетки (см., например, WO2013/033626, включенную в настоящее описание путем ссылки).

[0291] Внутриклеточный сигнальный домен CAR включает достаточную последовательность основной стимулирующей молекулы, чтобы генерировать внутриклеточный сигнал, например, при связывании ADBD, с которым он слит, с когнатной AD. В конкретных вариантах осуществления внутриклеточный сигнал CAR опосредует Т-клеточный ответ, выбранный из группы: пролиферации, секреции цитокинов, цитолиза, активации и дифференцировки.

[0292] В одном варианте осуществления внутриклеточная сигнальная область CAR включает домен, который содержит иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM). В другом варианте осуществления внутриклеточная сигнальная область CAR включает один или более ITAM-содержащих доменов из молекулы, выбранной из: TCR дзета (CD3 дзета), FcR гамма (FCER1G), Fc гамма RIIa, FcR бета (FCER1B), CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD5, CD22, CD79a, CD79b, DAP10, DAP12, CD32 (Fc гамма RIIa), CD79a и CD79b. В определенном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR включает сигнальный домен CD3 дзета. В другом определенном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR включает сигнальный домен DAP12. В некоторых вариантах осуществления ITAM-содержащий сигнальный домен обладает по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентичностью последовательности с, или отличается не больше чем 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотным остатком от соответствующих остатков природного ITAM-содержащего домена.

[0293] Примеры ITAM-содержащих основных цитоплазматических сигнальных последовательностей, которые находят конкретное применение в изобретении, включают последовательности, происходящие из TCR дзета, FcR гамма, FcR бета, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. Особенно предпочтительно, чтобы цитоплазматическая сигнальная молекула в CAR включала цитоплазматическую

сигнальную последовательность, происходящую из CD3 дзета.

[0294] В предпочтительном варианте осуществления цитоплазматический домен CAR включает сигнальный домен CD3-дзета отдельно или комбинации с любым другим требуемым цитоплазматическим доменом(ами), полезным в контексте CAR. Например, цитоплазматический домен CAR может включить часть дзета-цепи CD3 и костимулирующую сигнальную область. Костимулирующая сигнальная область относится к части CAR, включающей внутриклеточный домен костимулирующей молекулы. Костимулирующая молекула представляет собой поверхностную молекулу клеток, отличную от антигенноо рецептора или их лигандов, которая требуется для эффективного ответа лимфоцитов на антиген. Примеры таких молекул включают CD27, CD28, 41BB (CD 137), OX40, CD30, CD40, PD1, ICOS, лимфоцитарный функционально-ассоциированный антиген 1 (LFA1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7H3, TIM1 и LAG3.

[0295] "Костимулирующий домен" (CSD) при использовании в настоящем изобретении относится к части CAR, которая улучшает пролиферацию, выживание и/или развитие клеток памяти. CAR может включать один или более костимулирующих доменов. Каждый костимулирующий домен включает костимулирующий домен любого одного или более, например, члена суперсемейства TNFR, выбранного из CD28, CD137 (41BB), CD134 (OX40), Dap10, CD27, CD2, CD5, ICAM1, LFA1 (CD1 la/CD18), Lck, TNFRI, TNFRII, Fas, CD30 и CD40 или их комбинации. Другие костимулирующие домены (например, из других белков) будут специалистам в данной области и могут использоваться в рамках альтернативных вариантов осуществления изобретения.

[0296] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен CAR включает ITAM-содержащий домен и костимулирующий сигнальный домен, включающий функциональный фрагмент или аналог костимулирующей молекулы, который является достаточным, чтобы генерировать внутриклеточный сигнал при связывании внеклеточного ADBD, с которым он слит, с когнатным лигандом. В некоторых вариантах осуществления CAR включает костимулирующий сигнальный домен, соответствующий костимулирующему сигнальному домену, присутствующему в молекуле, выбранной из: CD137 (41BB), OX40, LIGHT, TNFR2, TRANCE/RANKL, GITR, BAFFR, HVEM, B7H3, CDS, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alpha, ITGA4, ITGA6, ITGAD, ITGAE, ITGAL, ITGAM, ITGAX, ITGB1, ITGB2, ITGB7, VLA1, VLA6, C49f, IA4, LFA1, CD2, CD4, CD7, CD8 alpha, CD8 beta, CD11A, CD11B, CD11C, CD11D, CD18, CD19, CD27, CD28, CD29, CD30, CD40, CD49A, CD49D, CD69, CD84, CD96, CD100, CD103, CD150, CD160, CD162, CD226, CD229, CD278, ICAM1, CEACAM1, CRTAM, PSGL1, SLAMF1, SLAMF4, SLAMF6, SLAMF7, SLAMF8, LTBR, LAT, GADS, PAG/Cbp, SLP76, NKG2C, NKp30, NKp44, NKp46 и NKp80.

[0297] В некоторых вариантах осуществления CAR включает костимулирующий домен, соответствующий костимулирующему домену, присутствующему в молекуле, выбранный из группы, состоящей из 41BB, CD28, CD27, ICOS и OX40.

[0298] В некоторых вариантах осуществления CAR включает множество костимулирующих доменов. В конкретных вариантах осуществления CAR включает

следующие костимулирующие сигнальные домены в направлении от внеклеточного к внутриклеточному: 41BB-CD27, CD27-41BB, 41BB-CD28, CD28-41BB, OX40-CD28, CD28-OX40, CD28-41BB или 41BB-CD28.

[0299] В некоторых вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен CAR обладает по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с, или отличается не больше чем 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотным остатком от соответствующих остатков природного костимулирующего домена.

[0300] В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 115, 116 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 117. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен имеющий последовательность, обладающую по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 115, 116 или 117. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 115, 116 или 117, включающую 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 вставок, делеций или замен. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 115, 116 или 117, включающую 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 или 10 вставок, делеций или замен. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 115, 116 или 117, включающую 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 или 10 замен.

[0301] Полипептидные линкеры могут быть расположены между соседними элементами CAR. Например, линкеры могут быть расположены между соседними ADBD или между ADBD и трансмембранным доменом, или между трансмембранным доменом и цитоплазматическим доменом, или между соседними цитоплазматическими доменами. Цитоплазматические сигнальные последовательности в цитоплазматической сигнальной части CAR могут быть соединены друг с другом в случайном или установленном порядке. Необязательно, короткий линкер, предпочтительно длиной от 2 до 10 аминокислот, может формировать такую связь. Глицин-сериновый дублет представляет особенно подходящий линкер.

[0302] В некоторых вариантах осуществления CAR включает мишень-связывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CAR включает трансмембранный домен CD8a, 41BB или CD28. В некоторых вариантах осуществления CAR трансмембранный домен включает трансмембранный домен CD8a. В некоторых вариантах осуществления CAR включает трансмембранный домен CD8a и внеклеточный спейсерный домен CD8a. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CD8a включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CD8a включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный

спейсерный домен (ESD) CD8a, также называемый шарнирным доменом, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112. В некоторых вариантах осуществления CAR включает внутриклеточный сигнальный домен, выбранный из группы, состоящей из домена альфа, бета или дзета-цепи T-клеточного рецептора человека; домена 41BB человека; домена CD28 человека; и их любой комбинации. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 115, 116 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 117. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен, имеющий последовательность, обладающую по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 115, 116 или 117. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 115, 116 или 117, включающую 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 вставок, делеций или замен. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 115, 116 или 117, включающую 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 или 10 вставок, делеций или замен. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 115, 116 или 117, включающую 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 или 10 замен. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR включает внутриклеточный домен костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из: CD27, CD28, 41BB, OX40, CD30, CD40, PD1, лимфоцитарного функционально-ассоциированного антигена 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лиганда, который специфично связывается с CD83, и их любой комбинации. В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно включает второй мишень-связывающий домен, имеющий такую же или другую мишень, чем мишень-связывающий домен DD. В некоторых вариантах осуществления CAR включает первый мишень-связывающий домен, который связывает CD123, и второй мишень-связывающий домен, который связывает другую мишень. В некоторых вариантах осуществления CAR включает первый и второй мишень-связывающие домены, мишень связывают CD123. В некоторых вариантах осуществления CAR экспрессируется в иммунной эффекторной клетке. В некоторых вариантах осуществления иммунной эффекторной клетка является T-клеткой (CAR-T-клеткой) или естественная киллерная клетка (NK) (CAR-NK-клетка). В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка является аутологичной клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка является аллогенной клеткой. В некоторых вариантах осуществления CAR ассоциирован с липосомой. В некоторых вариантах осуществления CAR включает мишень-связывающий домен, включающий DD, раскрытый в настоящем изобретении (например, DD, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8-33 или 74-94). В некоторых вариантах осуществления DD связывает CD123 и включает аминокислотную последовательность,

выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления CD123-специфичный DD включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления CD123-специфичный DD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления DD связывает р26 АФП и включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В некоторых вариантах осуществления DD связывает р26 АФП и включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70-73 или 92-94. В некоторых вариантах осуществления DD связывает р26 АФП и включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73. В некоторых вариантах осуществления CAR включает внеклеточную AD, включающую р26. В некоторых вариантах осуществления внеклеточная AD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO 37-43 или 44.

[0303] CAR-рецепторы, подходящие для применения в сочетании с DDpp (например, Адаптер и CAR), раскрытым в настоящем изобретении, были раскрыты в публ. междунар. заявок WO 2016164305, WO 2016164308A1, WO 2019099440 и WO 2019099433, патентах США 10,662,248 и 10,647,775, и заявках на патент США 20200223934 и 20210002381, которые включены в настоящее описание путем ссылки во всех отношениях.

Таблица 3 - Иллюстративные химерные антигенные рецепторы

SEQ ID NO:	Последовательность CAR	Мишень
62	DEMGSWDEFGRRLYAIESQLYALGGTEAELA AFEKEIAAFES ELQAYKKGKGNPEVEKLR EIAAVIRENLQAYRHNGGGGDGGG GSGTTTTAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDIYWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCKRGRKKLLYIFKQP FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYK QGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQALPPR	CD123
63	DEMGSWDEFGRRLYAIEAQLYALGGTEAELA AFEKEIAAFES ELQAYKKGKGNPEVEKLR EIAAVIRENLQAYRHNGGGGDGGG GSGTTTTAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDIYWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCKRGRKKLLYIFKQP FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYK QGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQALPPR	CD123
64	DEMGSWDEFGRRLYAIEEQLYALGGTEAELA AFEKEIAAFES ELQAYKKGKGNPEVEKLR EIAAVIRENLQAYRHNGGGGDGGG GSGTTTTAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDIYWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCKRGRKKLLYIFKQP FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYK QGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQALPPR	CD123
65	DEMGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGTEAELA AFEKEIAAFE SELQAYKKGKSPEVEKLR EIAAVIRENLQAYRHNGGGGDGGG GSGTTTTAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCKRGRKKLLYIFKQ	CD123

SEQ ID NO:	Последовательность CAR	Мишень
	PFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPPEMGGKPRRKN PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGL STATKDTYDALHMQALPPR	
66	DEMGSWDEFSRRLYAIEWQLYALGGTEAELAAFEKEIAAFES ELQAYKGEKSPEVEKLRELA AVIRENLQAYRHNGGGGDGGG GSGTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQP FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYK KQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPPEMGGKPRRKNP PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQALPPR	CD123
67	DEMGSWDEFSRRLYAIEWQLYAQGGTEAELAAFEKEIAAFES ELQAYKGEKSPEVEKLRELA AVIRENLQAYRHNGGGGDGGG GSGTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQP FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYK KQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPPEMGGKPRRKNP PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQALPPR	CD123
68	DEMGSWSEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELAAFEKEIAAFES ELQAYKGGKGNPEVESLREHAAAIREWQLQAYRHNGGGGDGG GSGTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPPEMGGKPRRKN PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGL STATKDTYDALHMQALPPR	p26 АФП
69	DEMGSWSEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELAAFEKEIAAFES ELQAYKGGKGNPEVESLRVHAAAIREWQLQAYRHNGGGGDGG GSGTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPPEMGGKPRRKN PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGL STATKDTYDALHMQALPPR	p26 АФП

D. Дополнительные слитые белки DDpp

[0304] В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит гетерологичный полипептид, включающий фрагмент, состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислот внеклеточного домена поверхностного рецептора клетки. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит гетерологичный полипептид, включающий внеклеточный домен или фрагмент внеклеточного домена BCMA (SEQ ID NO: 34) или CD123 (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит гетерологичный полипептид, включающий внеклеточный домен или фрагмент внеклеточного домена BCMA (SEQ ID NO: 34) или CD123 (SEQ ID NO: 1), или CS1 (SEQ ID NO: 35). В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит гетерологичный полипептид, включающий внеклеточный домен или

фрагмент внеклеточного домена, рецептора, выбранного из группы, состоящей из: CD19, CD20, CD22, HVEM, BTLA, DR3, CD37; TSLPR, IL7R и gp96.

[0305] В некоторых вариантах осуществления белок содержит гетерологичный полипептид, включающий сывороточный белок или антигенный фрагмент сывороточного белка (например, АФП и р26 АФП). В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит гетерологичный полипептид, включающий фрагмент, состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100, или 10-50 аминокислот сывороточного белка. В некоторых вариантах осуществления белок содержит гетерологичный полипептид, включающий внутриклеточный белок или антигенную часть внутриклеточного белка (например, ядерного белка). В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит гетерологичный полипептид, включающий фрагмент, состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислот внутриклеточного белка. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит гетерологичный полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 37-43 или 44.

[0306] В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp специфично связывает CD123 и/или р26 АФП и дополнительно связывает одну или больше дополнительных мишеней, представляющих интерес. Представляющие интерес мишени, специфично связываемые слитым белком DDpp, могут быть любой молекулой, для которой требуется связывание DDpp. Например, мишенями, специфично связываемыми слитым белком DDpp, могут быть CD123 и/или р26 АФП, и дополнительно любая дополнительная мишень производственного, фармацевтического, терапевтического, диагностического или прогностического значения или ценности. Различные примеры дополнительных мишеней представлены в настоящем изобретении в качестве примера и должны быть иллюстративными и неограничивающими. Дополнительная представляющая интерес мишень, связываемая слитым белком DDpp, может быть природной или синтетической. Дополнительная представляющая интерес мишень может быть внеклеточным компонентом или внутриклеточным компонентом, растворимым фактором (например, ферментом, гормоном, цитокином и фактором роста, токсином, ядом, загрязняющей примесью и т.д.) или трансмембранным белком (например, рецептором клеточной поверхности). В некоторых вариантах осуществления представляющая интерес мишень, которую связывает слитый белок DDpp, является человеческим белком. В одном варианте осуществления DDpp (например, слитый белок DDpp) связывает человеческий белок-мишень, представляющий интерес, и его ортолог обезьяны (например, яванского макака), мыши, кролика, хомяка и/или кролика. В некоторых вариантах осуществления дополнительной мишенью, представляющей интерес, является BCMA, CS1 или HER2

[0307] В одном варианте осуществления слитый белок DDpp специфично связывает CD123 и/или р26 АФП и сывороточный белок. В одном варианте осуществления слитый белок DDpp специфично связывает сывороточный белок, выбранный из: сывороточного альбумина (например, человеческого сывороточного альбумина (HSA)),

тироксинсвязывающего белка, трансферрина, фибриногена и иммуноглобулина (например, IgG, IgE и IgM). Без ограничения теорией, связывание DDpp с белком-носителем, как предполагают, придает DDpp (или его слитой конструкции) улучшенный фармакодинамический профиль, включающий, без ограничения этим, улучшенный таргетинг опухоли, проникновение в опухоль, диффузию в опухоли и улучшенную терапевтическую активность по сравнению со слитым белком DDpp, в котором связывающая последовательность белка-носителя отсутствует (см., например, WO01/45746, содержание которой полностью включено в настоящее описание путем ссылки).

Е. Слитые белки DDpp на основе антител

[0308] В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp включает полноразмерное антитело или фрагмент или субдомен антитела. В некотором варианте осуществления слитый белок DDpp включает полноразмерное антитело IgG (например, IgG1, IgG2, IgG2 или IgG4). В других вариантах осуществления слитый белок DDpp включает полноразмерное антитело, которое специфично связывает раковый антиген. В других вариантах осуществления DDpp включает коммерчески одобренное терапевтическое антитело (например, ритуксимаб, офатумумаб, окрелизумаб, велтузумаб, MEDI-551, эпратузумаб, белимумаб, табалумаб, AMG-557, MEDI-570 и NN882). В других вариантах осуществления DDpp включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с комплексом Т-клеточного рецептора (TCR) на Т-клетках (например, связывается с эpsilon-цепью CD3). В других вариантах осуществления DDpp является Fc-слитым белком. В других вариантах осуществления белок Fc включает вариантный человеческий Fc-домен.

[0309] В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp включает полноразмерное антитело или фрагмент антитела или субдомен (например, антитело IgG1, антитело IgG3, переменную область антитела, CDR3, scFv, Fc, FcRn связывающий субдомен и другие субдомены антител). Белки DDpp могут быть функционально связаны друг с другом и/или с одним или больше концами антитела, цепи антитела, фрагмента антитела или субдомена антитела, с получением слитого белка DDpp.

[0310] Иммуноглобулиновый компонент слитого белка DDpp может быть любым подходящим полноразмерным иммуноглобулином или фрагментом антитела (например, антигенсвязывающим доменом и/или эффекторным доменом) или его фрагментом. В одном варианте осуществления слитый белок DDpp-антитела сохраняет структурные и функциональные свойства обычного моноклонального антитела. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp-антитела сохраняет эпитопсвязывающие свойства, но предпочтительно также включает, посредством слияния с DDpp, одну или более дополнительных мишень-связывающих специфичностей. Антитела, которые могут использоваться в слитых конструкциях DDpp, включают, без ограничения, моноклональные, мультиспецифичные, человеческие, гуманизированные, приматизированные и химерные антитела. Молекулы иммуноглобулинов или антител,

представленные в настоящем изобретении, может относиться к любому типу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), классу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подклассу молекулы иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления антитела являются Fc-оптимизированными антителами. Антитела могут быть получены или могут происходить из любого животного, включая птиц и млекопитающих, или могут быть созданы искусственно. Иммуноглобулиновый компонент слитого белка DDpp-антитела может быть природным или может быть результатом рекомбинантной инженерии (например, фаговый дисплей, XenoMouse и синтетическим). В некоторых вариантах осуществления иммуноглобулиновый компонент слитого антитела-DDpp увеличивает полупериод существования, и увеличивает или уменьшает активность антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или комплементзависимой цитотоксичности (CDC). В некоторых вариантах осуществления антитела являются антитела человека, мыши, осла, кролика, козы, морской свинки, верблюда, ламы, лошади или курицы. В определенных вариантах осуществления антитела являются человеческими.

[0311] Общеизвестно, что константная область опосредует нескольких эффекторных функций. Например, связывание компонента C1 комплемента с антителами активирует систему комплемента. Активация комплемента важна при опсонизации и лизисе клеточных патогенов. Активация комплемента также стимулирует воспалительный ответ и может участвовать в аутоиммунной гиперчувствительности. Кроме того, антитела связываются с клетками посредством Fc-области, при связывании Fc-рецепторного участка на Fc-области антитела с Fc-рецептором (FcR) на клетке. Существует множество Fc-рецепторов, которые обладают специфичностью к различным классам антител, включая IgG (гамма-рецепторы), IgE (эта-рецепторы), IgA (альфа-рецепторы) и IgM (мю-рецепторы). Связывание антитела с Fc-рецепторами на поверхностях клеток инициирует множество важных и разнообразных биологических ответов, включая поглощение и разрушение покрытых антителами частиц, клиренс иммунных комплексов, лизис покрытых антителами клеток-мишеней клетками-киллерами (называемый антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью или ADCC), секреция воспалительных медиаторов, плацентарный перенос и контроль продукции иммуноглобулинов.

[0312] В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp-Fc имеет измененную эффекторную функцию, что, в свою очередь, влияет на биологический профиль вводимого слитого белка DDpp-Fc. Например, делеция или инактивация (посредством точечных мутаций или других средств) субдомена константной области может уменьшить связывание циркулирующего модифицированного антитела с Fc-рецептором. В других случаях модификации константной области могут уменьшать связывание комплемента и, таким образом, уменьшить полупериод существования в сыворотке и неспецифичную ассоциацию конъюгированного цитотоксина. Другие модификации константной области могут использоваться для удаления дисульфидных связей или олигосахаридных остатков, что обеспечивает улучшенную локализацию благодаря повышению антигенной специфичности или гибкости антитела. Аналогичным

образом, модификации в константной области в соответствии с данным изобретением могут быть легко выполнены с помощью технологии биохимической или молекулярной инженерии, известной средним специалистам в данной области.

[0313] В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp-Fc не имеет одной или более эффекторных функций. Например, в некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp-Fc не имеет активности антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или не имеет активности комплементзависимой цитотоксичности (CDC). В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp-Fc не связывается с Fc-рецептором и/или факторами комплемента. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp-Fc не имеет эффекторной функции. Примеры модификаций при инженерии Fc-последовательности, которые уменьшают или устраняют активность ADCC и/или CDC и связывание с Fc-рецептором и/или факторами комплемента, описаны в настоящем изобретении или иным образом известны из уровня техники, как и анализы и процедуры для исследования этого.

[0314] В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp-Fc сконструирован путем слияния домена CH3 непосредственно с шарнирной областью соответствующего модифицированного антитела. В других конструкциях пептидный спейсер встроен между шарнирной областью и модифицированными доменами CH2 и/или CH3. Например, могут экспрессироваться совместимые конструкции, в которых был удален домен CH2, а оставшийся домен CH3 (модифицированный или немодифицированный) соединен с шарнирной областью спейсером из 5-20 аминокислот. Такой спейсер может быть добавлен, например, чтобы гарантировать, что регуляторные элементы константного домена остались свободными и доступными, или что шарнирная область оставалась гибкой. В некоторых случаях аминокислотные спейсеры могут оказаться иммуногенными и могут вызвать нежелательный иммунный ответ против конструкции. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления любой спейсер, добавленный в конструкцию, может быть относительно неиммуногенным или даже может быть исключен, чтобы сохранить требуемые биохимические качества модифицированного слитого белка DDpp-Fc.

[0315] В дополнительных вариантах осуществления слитый белок DDpp-Fc модифицирован путем частичной делеции или замены нескольких аминокислот или даже одной аминокислоты в константной области. Например, мутация одной аминокислоты в выбранных областях домена CH2 может быть достаточной, чтобы существенно уменьшить связывание Fc. Аналогичным образом, один или более доменов константной области, которые регулируют эффекторную функцию (например, связывание C1Q комплемента), могут быть полностью или частично удалены. Такие частичные делеции константных областей могут улучшить выбранные характеристики слитого белка DDpp-Fc (например, полупериод существования в сыворотке), оставляя при этом без изменений другие нужные функции, связанные с соответствующим доменом константной области. В некоторых вариантах осуществления константная область слитого белка DDpp-Fc модифицирована посредством мутации или замены одной или более аминокислот, что улучшает профиль

полученной конструкции. В этом отношении можно нарушить активность, которую обеспечивает консервативный связывающий участок (например, связывание Fc), при этом по существу сохраняя конфигурацию и иммуногенный профиль модифицированного слитого белка DDpp-Fc. В настоящем изобретении также предложен слитый белок DDpp-Fc, который содержит вставку одной или более аминокислот в константной области для улучшения требуемых характеристик, таких как снижение или усиление эффекторной функции или обеспечение сайтов прикрепления одной или более молекул цитотоксинов, меток или углеводов. В таких вариантах осуществления может потребоваться вставить или реплицировать специфические последовательности, полученные из выбранных доменов константной области.

[0316] В некоторых вариантах осуществления DDpp функционально связан с фрагментом или субдоменом антитела (например, scFv, диателом, EP 404097; WO93/111161; WO14/028776; и Holliger et al., PNAS 90: 6444-6448 (1993), содержание которых полностью включено в настоящее описание путем ссылки). Фрагмент или субдомен антитела может быть любым фрагментом или доменом антитела. См., например, WO04/058820, WO99/42077 и WO05/017148, содержание которых полностью включено в настоящее описание путем ссылки. Например, слитый белок DDpp может содержать эффекторный домен антитела или производное эффекторного домена антитела, которое придает DDpp одну или более эффекторных функций и/или придает слитому белку DDpp способность связываться с одним или больше Fc-рецепторами. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp-антитела содержит антигенсвязывающий фрагмент антитела или его фрагмент. В дополнительных вариантах осуществления слитый белок DDpp-антитела содержит эффекторный домен иммуноглобулина, который включает один или более доменов CH2 и/или CH3 антитела, обладающего эффекторной функцией, обеспечиваемой доменами CH2 и CH3. Другие последовательности в слитом DDpp, которые обеспечивают эффекторную функцию и охвачены изобретением, будут известны специалистам в данной области и могут быть легко выбраны и сконструированы с получением слитого белка DDpp, включенного в настоящее описание, на основе требуемой эффекторной функции(й).

[0317] В одном варианте осуществления слитый DDpp содержит полноразмерное антитело или фрагмент антитела, который представляет собой антигенсвязывающий фрагмент. В другом варианте антитело или фрагмент антитела связывают антиген, ассоциированный с заболеванием. В одном варианте осуществления слитый белок DDpp включает антитело или фрагмент антитела, который специфично связывает раковый антиген. В другом варианте осуществления слитый белок DDpp включает антитело или фрагмент антитела, который специфично связывает конкретный патоген (например, клетку бактерии (например, туберкулеза, оспы, сибирской язвы)), вирус (например, ВИЧ), паразит (например, малярию, лейшманиоз), грибковую инфекцию, плесень, микоплазму, прионный антиген. В другом варианте осуществления слитый белок DDpp включает антитело или фрагмент антитела, который специфично связывает конкретный патоген (например, клетку

бактерии (например, туберкулеза, оспы, сибирской язвы)), вирус (например, ВИЧ), паразит (например, малярию, лейшманиоз), грибковую инфекцию, плесень, микоплазму или прионный антиген. В другом варианте осуществления слитый белок DDpp включает антитело или фрагмент антитела, который специфично связывает антиген, ассоциированный с заболеванием или нарушением иммунной системы.

[0318] В предпочтительных вариантах осуществления слитый белок DDpp, содержащий фрагмент или домен антитела, сохраняет активность исходного антитела. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp, содержащий фрагмент или домен антитела, способен индуцировать комплементзависимую цитотоксичность. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp, содержащий фрагмент или домен антитела, способен индуцировать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC).

[0319] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент антитела, который придает слитому белку DDpp биологические или биохимические характеристики иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела обладает характеристикой, выбранной из: способности к нековалентной димеризации, способности локализоваться на участке опухоли и увеличивать полупериод существования в сыворотке по сравнению со слитым белком DDpp, в котором удалены указанный один или более DDpp. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp является по меньшей мере таким же стабильным, как и соответствующее антитело без присоединенного DDpp. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp более стабилен, чем соответствующее антитело без присоединенного DDpp. Стабильность слитого белка DDpp можно измерить с использованием общепринятых методов, включая, например, методы ИФА. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp стабилен в цельной крови (*in vivo* или *ex vivo*) при 37°C в течение по меньшей мере приблизительно 10 часов, по меньшей мере приблизительно 15 часов, по меньшей мере приблизительно 20 часов, по меньшей мере приблизительно 24 часа, по меньшей мере приблизительно 25 часов, по меньшей мере приблизительно 30 часов, по меньшей мере приблизительно 35 часов, по меньшей мере приблизительно 40 часов, по меньшей мере приблизительно 45 часов, по меньшей мере приблизительно 48 часов, по меньшей мере приблизительно 50 часов, по меньшей мере приблизительно 55 часов, по меньшей мере приблизительно 60 часов, по меньшей мере приблизительно 65 часов, по меньшей мере приблизительно 70 часов, по меньшей мере приблизительно 72 часа, по меньшей мере приблизительно 75 часов, по меньшей мере приблизительно 80 часов, по меньшей мере приблизительно 85 часов, по меньшей мере приблизительно 90 часов, по меньшей мере приблизительно 95 часов или по меньшей мере приблизительно 100 часов (включая любое время между перечисленными значениями). В одном варианте осуществления слитый домен DDpp содержит эффекторный домен иммуноглобулина или домен, влияющий на полупериод существования, который соответствует домену или фрагменту иммуноглобулина, в котором, по меньшей мере, часть одного или более доменов

константной области была изменена для обеспечения требуемых биохимических характеристик, таких как сниженные или повышенные эффекторные функции, способность к нековалентной димеризации, повышенная способность локализоваться на участке опухоли, уменьшенный полупериод существования в сыворотке или увеличенный полупериод существования в сыворотке по сравнению с фрагментом иммуноглобулина, имеющим соответствующую неизмененную последовательность иммуноглобулина. Такие изменения доменов константной области могут быть аминокислотными заменами, вставками или делециями.

[0320] В одном варианте осуществления слитый белок DDpp включает аминокислотную последовательность эффекторного домена иммуноглобулина или производного эффекторного домена иммуноглобулина, которая придает антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) слитому белку DDpp. В дополнительных вариантах осуществления слитый белок DDpp включает последовательность эффекторного домена иммуноглобулина, которая была модифицирована с целью повышения ADCC (см., например, Bruhns, *Blood* 113: 3716-3725 (2009); Shields, *J. Biol. Chem.* 276: 6591-6604 (2001); Lazar, *PNAS* 103: 4005-4010 (2006); Stavenhagen, *Cancer Res.* 67: 8882-8890 (2007); Horton, *Cancer Res.* 68: 8049-8057 (2008); Zalevsky, *Blood* 113: 3735-3743 (2009); Bruckheimer, *Neoplasia* 11: 509-517 (2009); WO06/020114; Strohl, *Curr. Op. Biotechnol.* 20: 685-691 (2009); и WO04/074455; содержание которых включено путем ссылок полностью включено в настоящее описание путем ссылки). Примеры модификаций при инженерии фрагментов иммуноглобулина, содержащихся в аминокислотной последовательности в слитом белке DDpp, которые увеличивают ADCC, включают последовательности эффекторного домена иммуноглобулина, имеющие одну или более модификаций, соответствующих следующим: IgG1-S298A, E333A, K334A; IgG1-S239D, I332E; IgG1-S239D, A330L, I332E; IgG1-P247I, A339D или Q; IgG1-D280H, K290S с или без S298D или V; IgG1-F243L, R292P, Y300L; IgG1-F243L, R292P, Y300L, P396L; и IgG1-F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L; где нумерация остатков в Fc-области соответствует EU-индексу, описанному в публикации Кабата с соавт. (*Kabat et al.*, *Sequences of proteins of Immunological Interest*, 1991 Fifth edition, содержание которой полностью включено в настоящее описание путем ссылки).

[0321] В других вариантах осуществления слитый белок DDpp включает последовательность эффекторного домена иммуноглобулина, которая была модифицирована для снижения ADCC (см., например, публикации Idusogie *et al.*, *J. Immunol.* 166: 2571-2575 (2001); Sazinsky *et al.*, *PNAS* 105: 20167-20172 (2008); Davis *et al.*, *J. Rheumatol.* 34: 2204-2210 (2007); Bolt *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 23: 403-411 (1993); Alegre *et al.*, *Transplantation* 57: 1537-1543 (1994); Xu *et al.*, *Cell Immunol.* 200: 16-26 (2000); Cole *et al.*, *Transplantation* 68: 563-571 (1999); Hutchins *et al.*, *PNAS* 92: 11980-11984 (1995); Reddy *et al.*, *J. Immunol.* 164: 1925-1933 (2000); WO97/11971; WO07/106585; US 2007/0148167A1; McEarchern *et al.*, *Blood* 109: 1185-1192 (2007); Strohl, *Curr. Op. Biotechnol.* 20: 685-691 (2009); и Kumagai *et al.*, *J. Clin. Pharmacol.* 47: 1489-1497 (2007), содержание которых

полностью включено в настоящее описание путем ссылки). Примеры модификаций при инженерии последовательностей фрагментов иммуноглобулина, содержащихся в аминокислотной последовательности в слитом белке DDpp, которые уменьшают ADCC, включают последовательности эффекторных доменов иммуноглобулина, имеющие одну или более модификаций, соответствующих следующим: IgG1-K326W, E333S; IgG2-E333S; IgG1-N297A; IgG1-L234A, L235A; IgG2-V234A, G237A; IgG4-L235A, G237A, E318A; IgG4-S228P, L236E; IgG2- 118-260; IgG4-261-447; IgG2-H268Q, V309L, A330S, A331S; IgG1-C220S, C226S, C229S, p268S; IgG1-C226S, C229S, E233P, L234V, L235A; или IgG1-L234F, L235E, P331S; где нумерация остатков соответствует EU-индексу Кабата (*Kabat et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 1991 Fifth edition, содержание которой полностью включено в настоящее описание путем ссылки).

[0322] В дополнительных вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит аминокислотную последовательность эффекторного домена иммуноглобулина или производное эффекторного домена иммуноглобулина, которая обеспечивает антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) слитому белку DDpp. В дополнительных вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит последовательность эффекторного домена иммуноглобулина, которая была модифицирована для увеличения антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP); (см., например, *Shields et al.*, *J. Biol. Chem.* 276: 6591-6604 (2001); *Lazar et al.*, *PNAS* 103: 4005-4010 (2006); *Stavenhagen et al.*, *Cancer Res.* 67: 8882-8890 (2007); *Richards et al.*, *Mol. Cancer Ther.* 7: 2517-2527 (2008); *Horton et al.*, *Cancer Res.* 68: 8049-8057 (2008), *Zalevsky et al.*, *Blood* 113: 3735-3743 (2009); *Bruckheimer et al.*, *Neoplasia* 11: 509-517 (2009); WO06/020114; *Strohl*, *Curr. Op. Biotechnol.* 20: 685-691 (2009); и WO04/074455; содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте). Примеры модификаций при инженерии фрагментов иммуноглобулина, содержащихся в аминокислотной последовательности в слитом белке DDpp, которые увеличивают ADCP, включают последовательности эффекторного домена иммуноглобулина, имеющие одну или более модификаций, соответствующих следующим: IgG1-S298A, E333A, K334A; IgG1-S239D, I332E; IgG1-S239D, A330L, I332E; IgG1-P247I, A339D или Q; IgG1-D280H, K290S с или без S298D или V; IgG1-F243L, R292P, Y300L; IgG1-F243L, R292P, Y300L, P396L; IgG1-F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L; и IgG1-G236A, S239D, I332E; где нумерация остатков соответствует EU-индексу, описанному в публикации Кабата с соавт. (*Kabat et al.*, *Sequences of proteins of Immunological Interest*, 1991 Fifth edition, содержание которой включено путем ссылки полностью включено в настоящее описание путем ссылки).

[0323] В других вариантах осуществления слитый белок DDpp включает последовательность эффекторного домена иммуноглобулина, которая была модифицирована для снижения ADCP (см., например, *Sazinsky et al.*, *PNAS* 105: 20167-20172 (2008); *Davis et al.*, *J. Rheumatol.* 34: 2204-2210 (2007); *Bolt et al.*, *Eur. J. Immunol.* 23: 403-411 (1993); *Alegre et al.*, *Transplantation* 57: 1537-1543 (1994); *Xu et al.*, *Cell Immunol.* 200: 16-20 (2000); *Cole et al.*, *Transplantation* 68: 563-571 (1999); *Hutchins et al.*, *PNAS* 92:

11980-11984 (1995); Reddy *et al.*, *J. Immunol.* 164: 1925-1933 (2000); WO97/11971; WO07/106585; US 2007/0148167A1; McEarchern *et al.*, *Blood* 109: 1185-1192 (2007); Strohl, *Curr. Op. Biotechnol.* 20: 685-691 (2009); и Kumagai *et al.*, *J. Clin. Pharmacol.* 47: 1489-1497 (2007), содержание которых полностью включено в настоящее описание путем ссылки). Например, слитые белки DDpp могут содержать фрагмент или домен антитела, который содержит одну или более следующих модификаций, снижающих ADCC: IgG1-N297A; IgG1-L234A, L235A; IgG2-V234A, G237A; IgG4-L235A, G237A, E318A; IgG4-S228P, L236E; IgG2 EU sequence 118-260; IgG4-EU последовательность 261-447; IgG2-H268Q, V309L, A330S, A331S; IgG1-C220S, C226S, C229S, p268S; IgG1-C226S, C229S, E233P, L234V, L235A; и IgG1-L234F, L235E, P331S; где нумерация остатков соответствует EU-индексу, описанному в публикации Кабата с соавт. (Kabat *et al.*, *Sequences of proteins of Immunological Interest*, 1991 Fifth edition, содержание которой включено в настоящее описание путем ссылки).

[0324] В дополнительных вариантах осуществления слитый белок DDpp включает аминокислотную последовательность эффекторного домена иммуноглобулина или производного эффекторного домена иммуноглобулина, которая придает слитому белку DDpp комплементзависимую цитотоксичность (CDC). В дополнительных вариантах осуществления слитый белок DDpp включает последовательность эффекторного домена иммуноглобулина, которая была модифицирована для повышения комплементзависимой цитотоксичности (CDC) (см., например, публикации Idusogie *et al.*, *J. Immunol.* 166: 2571-2575 (2001); Strohl, *Curr. Op. Biotechnol.* 20: 685-691 (2009); и Natsume *et al.*, *Cancer Res.* 68: 3863-3872 (2008), содержание каждой из которых полностью включено в настоящее описание путем ссылки). В качестве примера, слитые белки DDpp могут содержать фрагмент или домен антитела, который содержит одну или более следующих модификаций, которые повышают CDC: IgG1-K326A, E333A; IgG1-K326W, E333S, IgG2-E333S; где нумерация остатков соответствует EU-индексу, описанному в публикации Кабата с соавт. (Kabat *et al.*, *Sequences of proteins of Immunological Interest*, 1991 Fifth edition, содержание которой полностью включено в настоящее описание путем ссылки).

[0325] В дополнительных вариантах осуществления слитый белок DDpp включает аминокислотную последовательность эффекторного домена иммуноглобулина или производного эффекторного домена иммуноглобулина, которая придает слитому DDpp способность связывать рецептор Fc-гамма RIIb. В дополнительных вариантах осуществления слитый белок DDpp включает последовательность эффекторного домена иммуноглобулина, которая была модифицирована для повышения ингибирующего связывания с рецептором Fc-гамма RIIb (см., например, Chu *et al.*, *Mol. Immunol.* 45: 3926-3933 (2008)). Примером модификации при инженерии фрагментов иммуноглобулина, содержащейся в аминокислотной последовательности слитого белка DDpp, которая увеличивает связывание с ингибирующим рецептором Fc-гамма RIIb, является IgG1-S267E, L328F.

[0326] В других вариантах осуществления слитый белок DDpp включает

последовательность эффекторного домена иммуноглобулина, которая была модифицирована для снижения CDC (см., например, WO97/11971; WO07/106585; US 2007/0148167A1; McEarchern *et al.*, Blood 109: 1185-1192 (2007); Hayden-Ledbetter *et al.*, Clin. Cancer 15: 2739-2746 (2009); Lazar *et al.*, PNAS 103: 4005-4010 (2006); Bruckheimer *et al.*, Neoplasia 11: 509-517 (2009); Strohl, Curr. Op. Biotechnol. 20: 685-691 (2009); и Sazinsky *et al.*, PNAS 105: 20167-20172 (2008); содержание которых полностью включено в настоящее описание путем ссылки). В качестве примера, слитые белки DDpp могут содержать фрагмент или домен антитела, который содержит одну или более следующих модификаций, снижающих CDC: IgG1-S239D, A330L, I332E; IgG2- 118-260; IgG4- 261-447; IgG2-H268Q, V309L, A330S, A331S; IgG1-C226S, C229S, E233P, L234V, L235A; IgG1-L234F, L235E, P331S; и IgG1-C226S, p260S; где нумерация остатков соответствует EU-индексу, описанному в публикации Кабата с соавт. (Kabat et al., Sequences of proteins of Immunological Interest, 1991 Fifth edition, содержание которой полностью включено в настоящее описание путем ссылки).

[0327] Полупериод существования IgG опосредован его pH-зависимым связыванием с неонатальным рецептором FcRn. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp включает аминокислотную последовательность эффекторного домена иммуноглобулина или производного эффекторного домена иммуноглобулина, которая придает слитому DDpp способность связывать неонатальный рецептор FcRn. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp включает последовательность FcRn-связывающего домена иммуноглобулина, которая была модифицирована для повышения связывания с FcRn (см., например, Petkova *et al.*, Int. Immunol. 18: 1759-1769 (2006); Dall'Acqua *et al.*, J. Immunol. 169: 5171-5180 (2002); Oganessian *et al.*, Mol. Immunol. 46: 1750-1755 (2009); Dall'Acqua *et al.*, J. Biol. Chem. 281: 23514-23524 (2006); Hinton *et al.*, J. Immunol. 176: 346-356 (2006); Datta-Mannan *et al.*, Drug Metab. Dispos. 35: 86-94 (2007); Datta-Mannan *et al.*, J. Biol. Chem. 282: 1709-1717 (2007); WO06/130834; Strohl, Curr. Op. Biotechnol. 20: 685-691 (2009); и Yeung *et al.*, J. Immunol. 182: 7663-7671 (2009); содержание которых полностью включено в настоящее описание путем ссылки).

[0328] В дополнительных вариантах осуществления слитый белок DDpp включает последовательность эффекторного домена иммуноглобулина, которая была модифицирована для обеспечения селективной аффинности к FcRn при pH 6,0, но не при pH 7,4. Например, слитые белки DDpp могут содержать фрагмент или домен антитела, который содержит одну или более следующих модификаций, которые увеличивают полупериод существования: IgG1-M252Y, S254T, T256E; IgG1-T250Q, M428L; IgG1-N433K, N434Y; IgG1-N434A; и IgG1-T307A, E380A, N434A; где нумерация остатков соответствует EU-индексу, описанному в публикации Кабата с соавт. (Kabat et al., Sequences of proteins of Immunological Interest, 1991 Fifth edition, содержание которой полностью включено в настоящее описание путем ссылки).

[0329] В других вариантах осуществления слитый белок DDpp включает последовательность эффекторного домена иммуноглобулина, которая была

модифицирована для уменьшения связывания с FcRn (см., например, Petkova *et al.*, *Int. Immunol.* 18: 1759-1769 (2006); Datta-Mannan *et al.*, *Drug Metab. Dispos.* 35: 86-94 (2007); Datta-Mannan *et al.*, *J. Biol. Chem.* 282: 1709-1717 (2007); Strohl, *Curr. Op. Biotechnol.* 20: 685-691 (2009); и Vaccaro *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 23: 1283-1288 (2005); содержание которых полностью включено в настоящее описание путем ссылки). В качестве примера, слитые белки DDpp могут содержать фрагмент или домен антитела, который содержит одну или более следующих модификаций, уменьшающих полупериод существования: IgG1-M252Y, S254T, T256E; X433K, H434Ф, 436X; IgG1-I253A; и IgG1-P257I, N434H и D376V, N434H; где нумерация остатков соответствует EU-индексу, описанному в публикации Кабата с соавт. (Kabat *et al.*, *Sequences of proteins of Immunological Interest*, 1991 Fifth edition, содержание которой полностью включено в настоящее описание путем ссылки).

[0330] Согласно другому варианту осуществления слитый белок DDpp включает аминокислотную последовательность, соответствующую эффекторному домену иммуноглобулина, которая была модифицирована так, чтобы она содержала по меньшей мере одну замену в его последовательности, соответствующей положению Fc-области (например, Fc-гамма), выбранному из группы, состоящей из: 238, 239, 246, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 и 439, где нумерация остатков в Fc-области соответствует системе нумерации EU Кабата с соавт. (Kabat *et al.*, *Sequences of proteins of Immunological Interest*, 1991 Fifth edition, содержание которой полностью включено в настоящее описание путем ссылки). В конкретном варианте осуществления слитый белок DDpp включает последовательность производного эффекторного домена иммуноглобулина, где по меньшей мере один остаток, соответствующий положению 434, представляет собой остаток, выбранный из группы, состоящей из: A, W, Y, F и H. Согласно другому варианту осуществления слитый белок DDpp включает последовательность производного эффекторного домена иммуноглобулина, где по меньшей мере один остаток, соответствующий положению 434, представляет собой остаток, выбранный из группы, состоящей из: A, W, Y, F и H. В варианте осуществления слитый белок DDpp включает последовательность производного эффекторного фрагмента иммуноглобулина, содержащую следующие соответствующие замены S298A/E333A/K334A. В дополнительном варианте осуществления слитый белок DDpp включает производное эффекторного домена иммуноглобулина, имеющее замену, соответствующую K322A. В другом варианте осуществления слитый белок DDpp включает последовательность производного эффекторного домена иммуноглобулина, содержащую одну или любую комбинацию следующих замен K246H, H268D, E283L, S324G, S239D и I332E. Согласно еще одному варианту осуществления слитый белок DDpp включает последовательность производного эффекторного домена иммуноглобулина, содержащую замены, соответствующие D265A/N297A.

[0331] В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp включает последовательность эффекторного домена иммуноглобулина, которая была подвергнута гликоинженерии или мутации с целью увеличения эффекторной функции с использованием методов, известных в уровне техники. Например, инактивация (посредством точечных мутаций или других средств) последовательности домена константной области, содержащейся в DDpp, может снизить связывание циркулирующего слитого белка DDpp с Fc-рецептором, что увеличит локализацию опухоли. В других случаях модификации константной области, соответствующая некоторым предложенным вариантам осуществления, может ослаблять связывание комплемента и, таким образом, уменьшать полупериод существования в сыворотке и неспецифическую ассоциацию конъюгированного цитотоксина. Другие модификации константной области могут использоваться для модификации дисульфидных связей или олигосахаридных остатков, которые обеспечивают улучшенную локализацию благодаря повышению антигенной специфичности или гибкости антитела. Получаемый в результате физиологический профиль, биодоступность и другие биохимические эффекты модификаций, такие как локализация опухоли, биораспределение и полупериод существования в сыворотке, могут быть легко измерены и количественно определены при использовании хорошо известных иммунологических методик без проведения излишних экспериментов.

[0332] В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка включает рецептор клеточной поверхности для иммуноглобулина или другой пептидсвязывающей молекулы, такой как рецептор константной области иммуноглобулина, и включающей класс рецепторов, обычно называемых "Fc-рецепторами" (FcR^R). Ряд FcR структурно и/или функционально исследованы и известны в уровне техники, включая FcR, обладающий специфическими способностями взаимодействовать с ограниченной подгруппой изотипов тяжелой цепи иммуноглобулинов, или которые взаимодействуют с Fc-доменами с разной аффинностью и/или которые могут экспрессироваться на ограниченных субпопуляциях иммунных эффекторных клеток при определенных условиях (например, Kijimoto-Ochichai *et al.*, Cell Mol. Life. Sci. 59: 648 (2002); Davis *et al.*, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 266: 85 (2002); Pawankar, Curr. Opin. Allerg. Clin. Immunol. 1: 3 (2001); Radaev *et al.*, Mol. Immunol. 38: 1073 (2002); Wurzburg *et al.*, Mol. Immunol. 38: 1063 (2002); Sulica *et al.*, Int. Rev. Immunol. 20: 371 (2001); Underhill *et al.*, Ann. Rev. Immunol. 20: 825 (2002); Coggeshall, Curr. Dir. Autoimm. 5: 1 (2002); Mimura *et al.*, Adv. Exp. Med. Biol. 495: 49 (2001); Baumann *et al.*, Adv. Exp. Med. Biol. 495: 219 (2001); Santoso *et al.*, Ital. Heart J. 2: 811 (2001); Novak *et al.*, Curr. Opin. Immunol. 13: 721 (2001); Fossati *et al.*, Eur. J. Clin. Invest. 31: 821 (2001)); содержание которых полностью включено в настоящее описание путем ссылки.

[0333] Клетки, которые способны опосредовать ADCC, являются примерами иммунных эффекторных клеток. Другие иммунные эффекторные клетки включают естественные киллерные клетки, инфильтрирующие опухоль Т-лимфоциты (ТIL), цитотоксические Т-лимфоциты и гранулоциты, такие как клетки, которые включают

механизмы аллергического ответа. Таким образом, иммунные эффекторные клетки включают, без ограничения, клетки гемопоэтического происхождения, в том числе клетки на различных стадиях дифференцировки внутри миелоидных и лимфоидных линий, и которые могут (но не обязательно) экспрессировать один или более типов функциональных FcR клеточной поверхности, таких как Т-лимфоциты, В-лимфоциты, NK-клетки, моноциты, макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы, базофилы, эозинофилы, тучные клетки, тромбоциты, эритроциты и предшественники, прогениторные клетки (например, гемопоэтические стволовые клетки), а также покоящиеся, активированные и зрелые формы таких клеток. Другие иммунные эффекторные клетки могут включать клетки негемопоэтического происхождения, которые способны опосредовать иммунные функции, например, эндотелиальные клетки, кератиноциты, фибробласты, остеокласты, эпителиальные клетки и другие клетки. Иммунные эффекторные клетки также могут включать клетки, которые опосредуют цитотоксические или цитостатические события, или эндоцитарные, фагоцитарные или пиноцитозные события, или которые влияют на индукцию апоптоза или влияют на микробный иммунитет или нейтрализацию микробной инфекции, или клетки, которые опосредуют аллергические, воспалительные реакции, реакции гиперчувствительности и/или аутоиммунные реакции.

F. Слитые белки DDpp с увеличенным полупериодом существования

[0334] Раскрытый DDpp может быть слит или включен в комплекс со вторым пептидным доменом для увеличения полупериода существования или стабильности DDpp.

[0335] В одном аспекте DDpp дополнительно включает одну или более аминокислот, которые облегчают синтез, манипуляции или применение пептида, включающих, без ограничения этим, один или два лизина на N-конце и/или C-конце для повышения растворимости полипептида. Подходящие слитые белки включают, без ограничения, белки, включающие DDpp, связанный с одним или больше полипептидами, фрагментами полипептидов или аминокислотами, которые обычно не входят в белковую последовательность. В одном аспекте слитый пептид включает полные аминокислотные последовательности двух или более пептидов или, в альтернативе, включает части (фрагменты) двух или более пептидов. В некоторых аспектах пептид (например, белок S-связывающий пептид) функционально связаны, например, с одним или больше из следующего: маркерный белок, пептид, который облегчает очистку, пептидная последовательность, которая способствует образованию мультимерных белков, или фрагмент любого из предыдущих. Подходящие партнеры по слиянию включают, без ограничения, His-метку, FLAG-метку, strep-метку и тус-метку.

[0336] В некоторых вариантах осуществления DDpp слит с одной или более молекулами, которые увеличивают полупериод существования полипептида. Полупериод существования может быть увеличен, например, путем увеличения молекулярной массы DDpp для предотвращения почечного клиренса и/или путем включения связывающего домена для FcRn-опосредованного пути рециркуляции. В одном варианте осуществления DDpp слит или химически конъюгирован с полипептидом альбумина или его фрагментом

(например, человеческим сывороточным альбумином (HSA)). В конкретных вариантах осуществления слитый или химически конъюгированный фрагмент альбумина включает 10%, 25%, 50% или 75% полноразмерного белка альбумина. В дополнительных или альтернативных вариантах осуществления DDpp слит или включен в комплекс с альбуминсвязывающим доменом или жирной кислотой, которая связывает альбумин при введении *in vivo*. Примером альбуминсвязывающего домена является "albu-метка", молекула, полученная из 4-(п-иодфенил)бутановой кислоты (Dumelin *et al.*, *Angew Chem. Int. Ed Engl.* 47: 3196-3201 (2008)).

[0337] В одном варианте осуществления DDpp слит или химически конъюгирован с полипептидом трансферрина или его фрагментом (например, человеческим трансферрином). В конкретных вариантах осуществления слитый или химически конъюгированный фрагмент трансферрина включает 10%, 25%, 50% или 75% полноразмерного белка трансферрина. В дополнительных или альтернативных вариантах осуществления DDpp слит или включен в комплекс с трансферринсвязывающим доменом, который связывает трансферрин при введении *in vivo*.

[0338] В некоторых вариантах осуществления DDpp слит или химически конъюгирован с пролин-аланин-сериновым мультимером (PAS-илирование; XL-Protein GmbH), неточной повторяющейся пептидной последовательностью (XTEN-илирование, rPEG), гомополимером из остатков глицина (HAP-илирование), последовательностями эластин-подобного повтора(ов) (ELP-илирование; см., например, заявку на пат. США 61/442,106, содержание которой полностью включено в настоящее описание путем ссылки), искусственной GLK (слитая GLK; Huang *et al.*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72: 435-41 (2010)) или СТР-пептидом из бета-субъединицы CG человека (слитый СТР).

G. Дополнительные слитые белки DDpp

[0339] В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp специфично связывает CD123 и/или p26 АФП, и дополнительно связывает антиген, ассоциированный с заболеванием. Ассоциированный с заболеванием антиген может быть антигеном, характерным для рака и/или клетки конкретного типа (например, гиперпролиферативной клетки), и/или патогена (например, клетки бактерии (например, туберкулеза, оспы и сибирской язвы), вируса (например, ВИЧ), паразита (например, малярии и лейшманиоза), микоза, плесени, мокоплазмы, прионным антигеном или антигеном, связанным с нарушением иммунной системы. В других вариантах осуществления слитый белок DDpp конъюгирован с терапевтическим или цитотоксическим средством.

[0340] В дополнительном варианте осуществления слитый белок DDpp соединен с одним или больше химическими молекулами (например, метками), которые облегчают обнаружение, мультимеризацию, связывание с партнером по взаимодействию или анализ активности DDpp. Примером такой химической молекулы является биотин. Другие молекулы, подходящие для конъюгирования с DDpp, включают, без ограничения перечисленным, фотосенсибилизатор, краситель, флуоресцентный краситель, радионуклид, радионуклидсодержащий комплекс, фермент, токсин и цитотоксическое

средство. Фотосенсибилизаторы включают, например, Photofrin, Visudyne, Levulan, Foscan, Metvix, Hexvix.RTM., Cysview.TM., Laserphyrin, Antrin, Photochlor, Photosens, Photrex, Lumacan, Cevira, Visonac, BF-200 ALA и Amphinex. В дополнительных вариантах осуществления DDpp конъюгирован с His-меткой, FLAG-меткой, strep-меткой или мус-меткой.

[0341] В другом варианте осуществления слитый белок DDpp включает DD, который связывает CD123, p26 АФП или их фрагмент и дополнительно связывает пептидную метку, присутствующую на представляющей интерес мишени. Такие пептидные метки предоставляют полезные средства, с помощью которых можно обеспечить обнаружение и/или прикрепление представляющих интерес мишеней, содержащих пептидные метки. В одном варианте осуществления слитый белок DDpp специфично связывает пептидную метку, выбранную из группы: гексагистидиновой (His6) метки, мус-метки или FLAG-метки. Другие пептидные метки описаны в настоящем изобретении или известны из уровня техники.

Н. Слитые белки DDpp с эпитопной меткой

[0342] В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp включает пептидную эпитопную метку. В некоторых вариантах осуществления пептидная метка выбрана из группы, состоящей из гексагистидиновой (His6) метки, мус-метки и FLAG-метки. В дополнительных вариантах осуществления пептидная метка включают, без ограничения, AviTag (дает возможность биотинилирования метки и выделения с использованием стрептавидина), кальмомодулин, E-метку, гемагглютинин (HA), S-метку, SBP-метку, Softag 1, стрептавидин, тетра или полицистеин, V5, VSV и метку Xpress. Дополнительно могут использоваться полигистидиновые метки (не из 6 остатков). В дополнительных вариантах осуществления могут использоваться ковалентные пептидные метки, белковые метки и т.п. Ковалентные пептидные метки включают, без ограничения, isopeptag (ковалентно связывает белок пилин C), Spytag (ковалентно связывается с белком SpyCatcher) и Snooptag (ковалентно связывается с белком SnoopCatcher). В других дополнительных вариантах осуществления необязательно могут использоваться белковые метки, включающие, без ограничения, белок-носитель карбоксила биотина (BCCP), глутатион-S-трансферазу, зеленый флуоресцентный белок (или другой флуорофор), Halo-метку, Nus-метку, тиоредоксин и Fc-метки. В других дополнительных вариантах осуществления могут использоваться различные типы меток. В других дополнительных вариантах осуществления метки не используются. В других дополнительных вариантах осуществления слитый белок DDpp включает удаляемую метку. Может использоваться любая комбинация внеклеточных, трансмембранных и внутриклеточных доменов, раскрытых в настоящем изобретении, в зависимости от варианта осуществления.

I. DDpp в качестве химических конъюгатов

[0343] Слитые белки DDpp (например, Адаптер), которые способствуют специфичному связыванию с мишенями, представляющими интерес, могут быть химически конъюгированы с различными соединениями, такими как флуоресцентные

красители, радиоизотопы, хроматографические композиции (например, гранулы, смолы, гели и т.д.) и химиотерапевтические средства. Применения конъюгатов слитого белка DDpp включают, без ограничения, диагностические, аналитические, производственные и терапевтические применения.

[0344] Изначальное отсутствие цистеинов в последовательности DD создает возможность для введения уникальных цистеинов в целях сайт-специфического конъюгирования.

[0345] В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp (например, Адаптер) содержит по меньшей мере один реакционно-активный остаток. Реакционно-активные остатки полезны, например, в качестве сайтов для присоединения конъюгатов, таких как химиотерапевтические средства. Реакционно-активный остаток может быть, например, цистеином, лизином или другим реакционно-активным остатком. Таким образом, цистеин может быть добавлен в DDpp на N- или на C-конец, или внутри последовательности DDpp. Цистеин может заменить другую аминокислоту в последовательности DDpp. Кроме того, лизин может быть добавлен в DDpp на любом конце или внутри последовательности DDpp, и/или лизин может заменить другую аминокислоту в последовательности DDpp. В одном варианте осуществления реакционно-активный остаток (например, цистеин, лизин и т.д.) расположен в последовательности петли DDpp (например, аминокислотных остатках, соответствующих остаткам 22-24 и 46-49 в SEQ ID NO: 2). В одном варианте осуществления реакционно-активный остаток расположен между компонентами слитого DDpp, например, в линкере, расположенном между DDpp и другим компонентом слитого белка DDpp. Реакционно-активный остаток (например, цистеин, лизин и т.д.) может быть также расположен внутри последовательности DDpp или в другом компоненте слитого белка DDpp. В одном варианте осуществления DDpp или слитый белок DDpp включает по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три реакционно-активных остатка. В одном варианте осуществления DDpp, такой как слитый белок DDpp, включает по меньшей мере один, по меньшей мере два, или по меньшей мере три остатка цистеина.

[0346] Такие выражения, как "аффинность связывания с мишенью", "связывание с мишенью" и т.п., относятся к свойству полипептида, которое может быть непосредственно измерено путем определения констант аффинности, например, количества DDpp, который связывается и диссоциирует при определенной концентрации антигена. Для анализа молекулярного взаимодействия могут использоваться различные методы, в том числе, помимо прочих, конкурентный анализ, равновесный анализ и микрокалориметрический анализ, а также анализ взаимодействия в реальном времени на основе резонансного взаимодействия поверхностных плазмонов (например, с использованием прибора Biacore®). Такие методы известны специалисту и описаны, например, в Neri et al., *Tibtech* 14: 465-470 (1996) и Jansson et al., *J Biol Chem* 272: 8189-8197 (1997).

[0347] Требования к аффинности для данного события связывания DDpp зависят от множества факторов, включающих, без ограничения: состав и сложность связывающей

матрицы, валентность и плотность DDpp и молекул-мишеней, а также функциональное применение DDpp. В одном варианте осуществления DDpp связывает представляющую интерес мишень (например, CD123 или p26 АФП) с константой диссоциации (KD) меньше или равной 5×10^{-3} М, 10^{-3} М, 5×10^{-4} М, 10^{-4} М, 5×10^{-5} М или 10^{-5} М. В дополнительном варианте осуществления DDpp связывает представляющую интерес мишень с KD меньше или равной 5×10^{-6} М, 10^{-6} М, 5×10^{-7} М, 10^{-7} М, 5×10^{-8} М или 10^{-8} М. В дополнительных вариантах осуществления DDpp связывает представляющую интерес мишень с KD меньше или равной 5×10^{-9} М, 10^{-9} М, 5×10^{-10} М, 10^{-10} М, 5×10^{-11} М, 10^{-11} М, 5×10^{-12} М, 10^{-12} М, 5×10^{-13} М, 10^{-13} М, 5×10^{-14} М, 10^{-14} М, 5×10^{-15} М или 10^{-15} М. В некоторых вариантах осуществления предложенный DDpp имеет константу диссоциации, выбранную из группы, состоящей от 10^{-4} М до 10^{-5} М, от 10^{-5} М до 10^{-6} М, от 10^{-6} М до 10^{-7} М, от 10^{-7} М до 10^{-8} М, от 10^{-8} М до 10^{-9} М, от 10^{-9} М до 10^{-10} М, от 10^{-10} М до 10^{-11} М и от 10^{-11} М до 10^{-12} М.

[0348] В некоторых вариантах осуществления DDpp связывает представляющую интерес мишень (например, CD123 или p26 АФП) в активной форме. В одном варианте осуществления DDpp обратимо связывает представляющую интерес мишень в активной форме, а также высвобождает связанную мишень в активной форме. В некоторых вариантах осуществления DDpp связывает представляющую интерес мишень в нативной форме. В конкретных вариантах осуществления DDpp связывает представляющую интерес мишень со скоростью диссоциации или K_{off} больше или равной 10^{-10} с⁻¹, 5×10^{-9} с⁻¹, 10^{-9} с⁻¹, 5×10^{-8} с⁻¹, 10^{-8} с⁻¹, 5×10^{-7} с⁻¹, 10^{-7} сек, 5×10^{-6} с⁻¹, 10^{-6} с⁻¹, 5×10^{-5} с⁻¹, 10^{-5} с⁻¹, 5×10^{-4} с⁻¹, 10^{-4} с⁻¹, 5×10^{-3} с⁻¹, 10^{-3} с⁻¹, 5×10^{-2} с⁻¹, 10^{-2} с⁻¹, 5×10^{-1} с⁻¹ или 10^{-1} с⁻¹.

[0349] Эксперименты по связыванию для определения значений KD и скорости диссоциации обычно можно проводить в различных условиях, включающих, без ограничения перечисленными, [рН 6,0, 0,01% Tween 2], [рН 6,0, 0,1% желатина], [рН 5,0, 0,01% Tween 2], [рН 9,0, 0,1% Tween 2], [рН 6,0, 15% этиленгликоля, 0,01% Tween 2], [рН 5,0, 15% этиленгликоля, 0,01% Tween 2] и [рН 9,0, 15% этиленгликоля, 0,01% Tween 2]. Буферы, в которых следует готовить такие растворы, обычно сможет определить специалист в данной области, при этом они во многом зависят от требуемого рН конечного раствора. Растворы с низким рН (<рН 5,5) можно готовить, например, в цитратном буфере, глицин-НСI-буфере или в сукцинатном буфере. Растворы с высоким рН можно готовить, например, в Трис-НСI, фосфатных буферах или натрий бикарбонатных буферах. Специалисты в данной области сумеют использовать различные условия для определения значений KD и скорости диссоциации в целях определения, например, оптимальных рН и/или концентраций соли.

[0350] В одном варианте осуществления DDpp специфично связывает представляющую интерес мишень (например, CD123 или p26 АФП) с K_{off} в пределах от 0,1 до 10^{-7} с⁻¹, от 10^{-2} до 10^{-7} с⁻¹ или 0,5. X от 10^{-2} до 10^{-7} с⁻¹. В конкретном варианте осуществления DDpp (например, слитый белок DDpp) связывает представляющую интерес мишень со скоростью диссоциации (K_{off}) меньше 5×10^{-2} с⁻¹, 10^{-2} с⁻¹, 5×10^{-3} с⁻¹ или 10^{-3} с⁻¹. В дополнительном варианте осуществления DDpp связывает представляющую интерес цель

со скоростью диссоциации (K_{off}) меньше $5 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, 10^{-4} c^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$ или 10^{-5} c^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ c}^{-1}$, 10^{-6} c^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ c}^{-1}$ или 10^{-7} c^{-1} .

[0351] В одном варианте осуществления DDpp специфично связывает представляющую интерес мишень (например, CD123 или p26 АФП) с K_{on} в пределах от 10^3 до $10^7 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$, от 10^3 до $10^6 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ или от 10^3 до $10^5 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$. В конкретном варианте осуществления DDpp (например, слитый белок DDpp) связывается с представляющей интерес мишенью со скоростью ассоциации (K_{on}) больше $10^3 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ или $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$. В дополнительном варианте осуществления DDpp связывает представляющую интерес мишень с K_{on} больше $10^5 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ или $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$, или $10^7 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$.

[0352] Настоящий документ охватывает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие раскрытый DDpp, а также векторы, содержащие такие нуклеиновые кислоты, клетки-хозяева, содержащие такие векторы нуклеиновой кислоты, а также способы получения слитых белков DDpp-альбумина и применение таких нуклеиновых кислот, векторов и/или клеток-хозяев. Изобретение также охватывает фармацевтические составы, включающие слитый белок DDpp-альбумина и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель. Такие составы могут применяться в способах лечения, предупреждения, облегчения или диагностики заболевания или симптома заболевания у пациента, предпочтительно млекопитающего, наиболее предпочтительно человека, включающих этап введения фармацевтического состава пациенту.

Конъюгаты DDpp-лекарственного средства

[0353] В другом варианте осуществления слитый белок DDpp может быть соединен с другими органическими или неорганическими молекулами или субстратами при использовании химического конъюгирования. В одном варианте осуществления конъюгаты DDpp-го средства предназначены для облегчения локальной доставки цитотоксических средств с использованием направленной специфичности DDpp. Такая комбинация направленной специфичности и цитотоксического средства обеспечивает адресную доставку лекарственного средства в опухоли и внутриклеточное накопление в них, тогда как системное введение таких неконъюгированных лекарственных средств может привести к неприемлемым уровням токсичности для нормальных клеток, в равной степени с опухолевыми клетками, которые нужно удалить (Baldwin *et al.*, Lancet pages 603-605 (1986); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic agents In Cancer Therapy: A Review," в Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera *et al.*, (ed.s), pp. 475-506 (1985)).

[0354] Цитотоксические средства включают химиотерапевтические средства, ингибиторы роста, токсины (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или его фрагменты), радиоактивные изотопы (т.е. радиоконъюгат) и т.д. Химиотерапевтические средства, подходящие для создания таких иммуноконъюгатов, включают, например, метотрексат, адриамицин, доксорубицин, мелфалан, митомицин С, хлорамбуцил, даунорубицин или

другие интеркалирующие средства. Химиотерапевтические средства, подходящие для создания таких иммуноконъюгатов, также включают антитубулиновые средства, такие как ауристатины, в том числе монометил ауристатин Е (ММАЕ) и монометил ауристатин F (ММАF). Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые могут использоваться в соответствии с раскрытыми способами, включают А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина, А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модецина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантины, белки *Phytolaca americana* (РАPI, РАPII и РАP-S), ингибитор из *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор из *Saponaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотецены.

[0355] В одном варианте осуществления DDpp (например, слитый белок DDpp) конъюгирован с радиоизотопом. В дополнительном варианте осуществления DDpp конъюгируют с изотопом, выбранным из ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{123}I , ^{111}In , ^{105}Rh , ^{153}Sm , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re и ^{188}Re , при использовании любого из известных хелатообразователей или прямого мечения. В других вариантах осуществления DDpp связан с лекарственными средствами, пролекарствами или лимфокинами, такими как интерферон. Конъюгаты DDpp и цитотоксина обычно могут получать с использованием различных бифункциональных белоксвязывающих реагентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридидитиол)пропионат (SPDP), иминотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCL), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаровый альдегид), бис-азидосоединения (такие как бис(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис(п-диазонийбензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). В конкретном варианте осуществления токсин конъюгирован со слитым белком DDpp через расщепляемую ферментами линкерную систему (например, такую, которая присутствует в SGN-35). Также могут использоваться конъюгаты DDpp и одного или более низкомолекулярных токсинов, таких как калихеамицин, майтанзиноиды, трихотецен и CC1065, а также производные этих токсинов, обладающие токсической активностью.

[0356] В некоторых вариантах осуществления цитотоксическое средство ковалентно присоединено к DDpp через линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер, соединяющий DDpp и цитотоксическое средство, может расщепляться протеазой.

Созревание аффинности и деиммунизация DD и DDpp

[0357] Стратегии созревания аффинности могут использоваться для создания DD и DDpp с высокой аффинностью, которые могут использоваться в слитых белках DDpp, описанных в настоящем изобретении. Улучшенные DD и DDpp, которые специфично связывают требуемую мишень (например, BCAM, CD123, CS1, HER2, АФП и p26 АФП), также могут быть получены на основе известной референсной последовательности DDpp. Например, по меньшей мере одна, две, три, четыре, пять или больше аминокислотных мутаций (например, консервативных или неконсервативных замен), делеций или вставок

могут быть введены в последовательность DD, раскрытую в Таблице 1 (т.е. референсную последовательность), и полученный DDpp может быть подвергнут скринингу на связывание с соответствующей мишенью и биологическую активность, такую как способность антагонистически воздействовать на биологическую активность соответствующей мишени или агонистически воздействовать на биологическую активность соответствующей мишени.

[0358] Описанные DDpp, в особенности такие, которые вводят субъекту, предпочтительно не являются антигенными по отношению к субъекту (например, человеку). В некоторых вариантах осуществления последовательность DDpp не содержит связывающий мотив HLA-DR человека или участки расщепления для протеасом и иммунных протеасом. В конкретных вариантах осуществления последовательность DDpp не содержит антигенную последовательность, как определено с использованием компьютерной прогностической модели версии, существующей на дату подачи настоящего описания. В конкретных вариантах осуществления последовательность DDpp не содержит последовательность участка связывания МНС (класса I или класса II), как предсказано с использованием алгоритма, выбранного из Singh, *Bioinformatics* 17(12): 1236-1237 (2001)), ProPred1 (Singh, *Bioinformatics* 19(8): 1009-14 (2003)), SYFPEITHI (see, e.g., Schuler, *Immunoinf. Meth. in Mol. Biol.* 409(1): 75-93 (2007)), SMM-align (см., например, Nielsen, *BMC Bioinformatics* 8: 238 (2007)), RANKPEP (см., например, Reche, *Hum Immunol* 63: 701-709 (2004)) или TERITOPe (см. Sturniolo, *Nat Biotechnol* 17: 555-561 (1999)), где версия алгоритма и применяемая база данных существуют на дату подачи настоящей заявки. В некоторых вариантах осуществления DDpp не содержит последовательность, которая имеет общие характеристики с высокоаффинным Т-клеточным эпитопом (с порогом связывания ниже 6%). (Singh, *Bioinformatics* 17: 1236-1237 (2001)). В некоторых вариантах осуществления DDpp не содержит последовательность, которая имеет общие характеристики с универсальным (присутствующим более чем в 50% соответствующих аллелей) Т-клеточным эпитопом (Singh, *Bioinformatics* 17: 1236-1237 (2001)). В некоторых вариантах осуществления DDpp не содержит последовательность, которая имеет общие характеристики с высокоаффинным или универсальным Т-клеточным эпитопом. В конкретных вариантах осуществления DDpp не содержит последовательность LAAIKTRLQ (SEQ ID NO: 49). Методы создания, скрининга и идентификации вариантов DDpp с созревшей аффинностью и вариантов мишень-связывающих DDpp, содержащих изменение последовательности, которое удаляет предсказанную последовательность участка связывания МНС (класса I или класса II) известны в уровне техники.

Полинуклеотиды

[0359] Изобретение также относится к полинуклеотидам, включающим нуклеотидную последовательность, кодирующую DDpp (например, Адаптер или CAR). Такие полинуклеотиды необязательно дополнительно включают один или более элементов контроля экспрессии. Например, в качестве элементов контроля экспрессии полинуклеотид может включать один или более промоторов или энхансеров транскрипции, участки

связывания рибосом, сигналы терминации транскрипции и сигналы полиаденилирования. Полинуклеотид может быть встроен в любой подходящий вектор, который может содержаться в любой клетке-хозяине, подходящей для экспрессии.

[0360] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, раскрытый в настоящем изобретении, кодирует полипептид, включающий D-домен, который связывается с CD123. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

[0361] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, раскрытый в настоящем изобретении, кодирует химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR включает D-домен, который связывается с CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления CAR включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62-66 или 67. В некоторых вариантах осуществления CAR включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67.

[0362] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, раскрытый в настоящем изобретении, кодирует химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR включает: (i) D-домен, который связывается с AD p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления DD, который связывается с p26 АФП, включает аминокислотную последовательность AD, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В некоторых вариантах осуществления DD, который связывается с p26 АФП, включает аминокислотную последовательность AD SEQ ID NO: 70-73 или 92-94. В некоторых вариантах осуществления DD, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73. В некоторых вариантах осуществления CAR включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления CAR включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69.

[0363] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, раскрытый в настоящем изобретении, кодирует химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR включает: (i) антигенную детерминанту (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii)

внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления AD р26 АФП включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-43 и 44. В некоторых вариантах осуществления AD р26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления AD р26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

[0364] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, раскрытый в настоящем изобретении, кодирует Адаптер, включающий: (a) D-домен (DD), который связывается с CD123, и (b) антигенную детерминанту (AD). В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления Адаптер представляет собой моновалентный Адаптер, включающий один D-домен, который связывает CD123. В некоторых вариантах осуществления Адаптер представляет собой бивалентный Адаптер, включающий два D-домена, которые связывают CD123. В некоторых вариантах осуществления два D-домена, которые связывают CD123, являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления два D-домена, которые связывают CD123, являются разными. В некоторых вариантах осуществления Адаптер представляет собой бивалентный Адаптер, включающий первый D-домен, который связывает CD123, и второй D-домен, который связывает вторую AD. В некоторых вариантах осуществления второй AD является CD33 или LeY. В некоторых вариантах осуществления моновалентный Адаптер включает D-домен, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления моновалентный Адаптер включает D-домен, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления бивалентный Адаптер включает DD, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления бивалентный Адаптер включает D-домен, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления бивалентный Адаптер включает два идентичных D-домена, включающие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления бивалентный Адаптер включает два идентичных D-домена, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает антигенную детерминанту (AD) р26 АФП. В некоторых вариантах осуществления AD р26 АФП включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-43 и 44. В некоторых вариантах осуществления AD р26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах

осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления моновалентный Адаптер включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50-54 или 55. В некоторых вариантах осуществления моновалентный Адаптер включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления бивалентный Адаптер включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56-60 или 61. В некоторых вариантах осуществления моновалентный Адаптер включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает один или более линкеров.

[0365] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, раскрытый в настоящем изобретении, кодирует Адаптер, включающий: (a) D-домен, который связывается с CD123, и (b) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывает AD p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-43 и 44. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления ADBД, который связывается с AD p26 АФП, включает D-домен, который связывается с AD p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 70-73 и 92-94. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает один или более линкеров.

[0366] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, раскрытый в настоящем изобретении, кодирует Адаптер, включающий: (a) первый домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой-мишенью (AD) на клетке-мишени, и (b) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с AD p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-43 и 44. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления ADBД, который связывается с AD p26 АФП,

включает D-домен, который связывается с p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 70-73 и 92-94. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает один или более линкеров.

[0367] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой ДНК.

[0368] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой РНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой мРНК. В некотором варианте осуществления РНК, например мРНК, включает модифицированные рибонуклеотиды.

[0369] В некоторых вариантах осуществления мРНК, раскрытая в настоящем изобретении, включает кодирующую область, кодирующую полипептид, раскрытый в настоящем изобретении, и дополнительно включает одну или более из 5'-нетранслируемой области, 3'-нетранслируемой области, 5'-кэпа и сигнала полиаденилирования. В некоторых вариантах осуществления мРНК, раскрытая в настоящем изобретении, включает кодирующую область, кодирующую полипептид, раскрытый в настоящем изобретении, 5'-нетранслируемую область, 3'-нетранслируемую область, 5'-кэп и сигнал полиаденилирования. В некоторых вариантах осуществления мРНК, раскрытая в настоящем изобретении, включает модифицированные рибонуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления мРНК включает N1-метилпсевдоуридин или N1-этилпсевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления 5'-концевой кэп представляет собой 7mG(5')ppp(5')N1mpNp. См., например, US20200261572, US20190351040 и US20190211065, которые полностью включены в настоящее описание путем ссылки.

[0370] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид является вектором, включающим полинуклеотид, описанный в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления вектор является вектором для переноса, подходящим для применения в получении рекомбинантного лентивируса. В некоторых вариантах осуществления вектор является лентивирусным вектором, кодирующим полипептид, раскрытый в настоящем изобретении (например, CAR). В некоторых вариантах осуществления лентивирусный вектор подходит для трансформации иммунной клетки (например, Т-клетки или НК-клетки) для получения клетки, экспрессирующей полипептид (например, CAR).

[0371] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид является рекомбинантным вирусом, включающим полинуклеотид, описанный в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид является рекомбинантным лентивирусом, включающим полинуклеотид, кодирующий полипептид (например, CAR), описанный в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид является вектором на основе рекомбинантного аденовируса

или адено-ассоциированного вируса (AAV).

Получение DDpp

[0372] Раскрытый DDpp (например, Адаптер) может быть получен стандартными методами с использованием доступных в продаже реагентов и методов, известных в уровне техники. В одном варианте осуществления DDpp синтезируют с помощью методов твердофазного синтеза, известных в уровне техники, таких как описанные в публикациях Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149 (1963); Davis et al., *Biochem. Intl.* 10: 394-414 (1985); Larsen et al., *J. Am. Chem. Soc.* 115: 6247 (1993); Smith et al., *J. Peptide Protein Res.* 44: 183 (1994); O'Donnell et al., *J. Am. Chem. Soc.* 118: 6070 (1996); Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, Freeman (1969); Finn et al., *The Proteins*, 3.sup.rd ed., 2: 105-253 (1976); и Erickson et al., *The Proteins*, 3.sup.rd ed., 2: 257-527 (1976). В изобретении рассматриваются синтетические пептиды. Также пептид экспрессируется рекомбинантно путем введения нуклеиновой кислоты, кодирующей раскрытый DDpp, в клетки-хозяева, которые культивируют для экспрессии пептида. Такие пептиды очищают из сред культивирования или осадков клеток.

[0373] Получение DDpp, полезного при практической реализации предложенных способов, можно проводить с использованием множества стандартных методов химического синтеза, полусинтетических методов и методик рекомбинантных ДНК, известных в уровне техники. Также предложен способ получения DDpp, индивидуально или в виде части мультидоменного слитого белка, в качестве растворимых средств и клеточноассоциированных белков.

[0374] Необязательно, референсная последовательность и/или модифицированные полипептиды (например, DDpp) могут быть деиммунизированы. Например, остатки или мотивы, которые являются потенциально иммуногенными, могут быть идентифицированы и модифицированы с целью уменьшения или устранения потенциальных иммунных ответов на DDpp. Дополнительные подробности относительно различных вариантов получения, отбора и выделения DDpp представлены более подробно ниже.

А. Рекомбинантная экспрессия DDpp

[0375] В некоторых вариантах осуществления DDpp, такой как слитый белок DDpp (например, Адаптер), "получен рекомбинантно" (т.е. получен с использованием технологии рекомбинантных ДНК). Примеры рекомбинантных способов, доступных для синтеза слитых белков DDpp, включают, без ограничения, синтез на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), конкатемеризацию, бесшовное клонирование и рекурсивное направленное лигирование (RDL) (см., например, Meyer *et al.*, *Biomacromolecules* 3: 357-367 (2002); Kurihara *et al.*, *Biotechnol. Lett.* 27: 665-670 (2005); Haider *et al.*, *Mol. Pharm.* 2: 139-150 (2005); and McMillan *et al.*, 32: 3643-3646 (1999); содержание которых полностью включено в настоящее описание путем ссылки).

[0376] Изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, включающим полинуклеотидную последовательность, кодирующую DDpp (например, Адаптер или CAR). Такие полинуклеотиды необязательно дополнительно включают один или более

элементов контроля экспрессии. Например, в качестве элементов контроля экспрессии полинуклеотид может включать один или более промоторов или энхансеров транскрипции, участки связывания рибосом, сигналы терминации транскрипции и сигналы полиаденилирования. Полинуклеотид может быть встроен в любой подходящий вектор, который может содержаться в любой клетке-хозяине, подходящей для экспрессии.

[0377] Экспрессия нуклеиновых кислот, кодирующих DDpp (например, Адаптер или CAR), обычно достигается путем функционального соединения нуклеиновой кислоты, кодирующей DDpp, с промотором в векторе экспрессии. Типичные векторы экспрессии содержат терминаторы транскрипции и трансляции, последовательности инициации и промоторы, подходящие для регуляции экспрессии требуемой последовательности нуклеиновой кислоты. Способы, известные в уровне техники, могут использоваться для стандартного конструирования векторов экспрессии, содержащих последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую DDpp, вместе с соответствующими сигналами контроля транскрипции/трансляции. Эти способы включают, помимо прочего, технологии рекомбинантных ДНК *in vitro*, методы синтеза и рекомбинацию/генетическую рекомбинацию *in vivo*. Экспрессию полинуклеотида можно проводить в любом подходящем хозяине экспрессии, известном в уровне техники, включая, помимо прочего, клетки бактерий, клетки дрожжей, клетки насекомых, клетки растений или клетки млекопитающих. В одном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая DDpp, функционально связана с подходящей последовательностью промотора, в результате чего последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируется и/или транслируется с получением DDpp в организме хозяина.

[0378] В одном варианте осуществления вектор, включающий нуклеиновую кислоту, кодирующую DDpp (например, Адаптер), вводят в клетку-хозяина для экспрессии DDpp. Вектор может оставаться эпизомным или интегрироваться в хромосому при условии, что вставка, кодирующая терапевтическое средство, сможет транскрибироваться. Векторы могут быть сконструированы с применением стандартной технологии рекомбинантных ДНК. Векторы могут быть плазмидами, фагами, космидами, фагмидами, вирусами или любого другого типа, известные в уровне техники, которые используются для репликации и экспрессии в прокариотических или эукариотических клетках. Специалисту в данной области будет известно, что в такие векторы может быть включен целый ряд компонентов, известных в данной области (таких как элементы контроля экспрессии), включающий широкое разнообразие сигналов транскрипции, таких как промоторы и другие последовательности, которые регулируют связывание РНК-полимеразы с промотором. Любой промотор, который, как известно или было продемонстрировано, является эффективным в клетках, в которых будет экспрессироваться вектор, может использоваться для инициации экспрессии DDpp. Подходящие промоторы могут быть индуцируемыми (например, регулируемые) или конститутивными. Неограничивающие примеры подходящих промоторов включают раннюю промоторную область SV40, промотор, содержащийся в 3'-концевом повторе вируса саркомы Рауса, промотор тимидинкиназы

ВПГ-1 (вируса простого герпеса-1), регуляторные последовательности гена металлотионеина и т.д., а также следующие области контроля транскрипции животных, которые демонстрируют тканеспецифичность и использовались у трансгенных животных: область контроля гена эластазы I, которая активна в ацинарных клетках поджелудочной железы; область контроля гена инсулина, которая активна в бета-клетках поджелудочной железы, область контроля вируса опухоли молочной железы мышей, которая активна в тестикулярных, молочной железы, лимфоидных и тучных клетках, область контроля гена альбумин, которая активна в печени, область контроля гена альфа-фетопротеина, которая активна в печени, область контроля гена альфа-1-антитрипсина, которая активна в печени, область контроля гена бета-глобина, которая активна в эритроидных клетках, область контроля гена основного белка миелина, которая активна в клетках олигодендроцитов в головном мозге, область контроля гена легкой цепи миозина-2, которая активна в скелетной мышце, и область контроля гена гонадотропин-рилизинг-гормона, которая активна в гипоталамусе. В конкретном варианте осуществления промотор представляет собой область контроля гена иммуноглобулина, которая активна в лимфоидных клетках.

[0379] В одном варианте осуществления одна или больше нуклеиновых кислот, кодирующих DDpp (например, Адаптер), экспрессируются под контролем конститутивного промотора или, в альтернативе, регулируемой системы экспрессии. Подходящие регулируемые системы экспрессии включают, без ограничения перечисленными, тетрациклин-регулируемую систему экспрессии, экдизон-индуцируемую систему экспрессии, систему экспрессии LacSwitch, глюкокортикоид-индуцируемую систему экспрессии, систему с термоиндуцируемым промотором и металл-индуцируемую систему экспрессии металлотионеина. Если в системе клеток-хозяев содержится несколько разных нуклеиновых кислот, кодирующих DDpp, некоторые из нуклеиновых кислот могут экспрессироваться под контролем конститутивного промотора, а другие могут экспрессироваться под контролем регулируемого промотора. Уровни экспрессии можно определять с помощью методов, известных в данной области, включая Вестерн-блоттинг и Нозерн-блоттинг.

[0380] Для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей DDpp (например, Адаптер), могут использоваться различные системы хозяина-вектора экспрессии. Векторы, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие DDpp (например, отдельные субъединицы DD или слитые DDpp) или их части или фрагменты, включают плазмидные векторы, одно- и двухцепочечные фаговые векторы, а также одно- и двухцепочечные РНК или ДНК вирусные векторы. Фаговые и вирусные векторы также можно вводить в клетки-хозяева в форме упакованного или инкапсулированного вируса с использованием известных методик инфицирования и трансдукции. Более того, вирусные векторы могут быть репликационно компетентными или, альтернативно, репликационно дефектными. В альтернативе для получения белка также могут использоваться бесклеточные системы трансляции с использованием РНК, полученных из экспрессионных конструкций ДНК (см., например, WO86/05807 и WO89/01036; и пат. США 5,122,464; содержание которых полностью

включено в настоящее описание путем ссылки).

[0381] Как правило, любой тип клеток или культивируемой линии клеток может использоваться для экспрессии DDpp (например, Адаптера), раскрытого в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления фоновая клеточная линия, используемая для создания модифицированных клеток-хозяев, представляет собой фаг, бактериальную клетку, дрожжевую клетку или клетку млекопитающего. Для экспрессии кодирующей последовательности слитого белка DDpp могут использоваться различные системы хозяина-вектора экспрессии. Клетки млекопитающих могут использоваться в качестве систем клеток-хозяев, трансфицированных рекомбинантными векторами экспрессии в форме плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащими кодирующую последовательность представляющей интерес мишени и кодирующую последовательность слитого полипептида.

[0382] Клетки могут представлять собой первичные изоляты из организмов (включая человека), культуры или клеточные линии трансформированной или трансгенной природы. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку человека. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой Т-клетку человека. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин получена у пациента-человека.

[0383] Подходящие клетки-хозяева включают, без ограничения этим, такие микроорганизмы, как бактерии (например, *E. coli*, *B. subtilis*, *P. fluorescens*), трансформированные рекомбинантными векторами экспрессии в форме ДНК бактериофага, плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащими последовательности, кодирующие DDpp (например, Адаптер); дрожжи (например, *Saccharomyces*, *Pichia*), трансформированные рекомбинантными дрожжевыми векторами экспрессии, содержащими последовательности, кодирующие DDpp; системы клеток насекомых, инфицированные рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, бакуловирусными), содержащими кодирующие последовательности DDpp; системы растительных клеток, инфицированных рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, на основе вируса мозаики цветной капусты, CaMV; вируса табачной мозаики, TMV) или трансформированных рекомбинантными плазмидными векторами экспрессии (например, Ti-плазмидой), содержащими кодирующие последовательности DDpp. В конкретных вариантах осуществления для продукции DDpp используются системы на основе клеток млекопитающих. В системах на основе клеток млекопитающих обычно используются рекомбинантные экспрессионные конструкции, содержащие промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих (например, промотор металлотioneина) или из вирусов млекопитающих (например, поздний промотор аденовируса; промотор 7,5К вируса осповакцины).

[0384] Прокариоты, подходящие в качестве клеток-хозяев при получении DDpp, такого как слитый белок DDpp (например, Адаптер), включают грамотрицательные или грамположительные организмы, такие как *E. coli* и *B. subtilis*. Векторы экспрессии для

применения в прокариотических клетках-хозяевах обычно содержат один или более фенотипически селективных маркерных генов (например, генов, кодирующих белки, которые придают устойчивость к антибиотикам или обеспечивают аутотрофное требование). Примеры подходящих прокариотических векторов экспрессии в хозяевах включают серии векторов pKK223-3 (Pharmacia, Uppsala, Sweden), pGEM1 (Promega, Wis., USA), pET (Novagen, Wis., USA) и pRSET (Invitrogen, Calif., USA) (см., например, Studier, J. Mol. Biol. 219:37 (1991) и Schepfer, Gene 124:83 (1993)). Типичные промоторные последовательности, часто используемые в векторах экспрессии прокариотических клеток-хозяевах, включают T7 (Rosenberg et al., Gene 56: 125-135 (1987)), бета-лактамазу (пенициллиназу), систему лактозного промотора (Chang et al., Nature 275: 615 (1978) и Goeddel et al., Nature 281: 544 (1979)), систему промотора триптофана (*trp*) (Goeddel et al., Nucl. Acids Res. 8: 4057 (1980)) и *tac*-промотор (Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.).

[0385] В одном варианте осуществления используются системы на основе эукариотических клеток-хозяев, включающие дрожжевые клетки, трансформированные рекомбинантными дрожжевыми векторами экспрессии, содержащими кодирующую последовательность DDpp (например, Адаптера), такие как системы экспрессии, описанные в заявке U.S. 60/344,169 и WO 03/056914 (способы получения подобного человеческого гликопротеина в нечеловеческой эукариотической клетке-хозяине) (содержание которых полностью включено в настоящее описание путем ссылки). Примеры дрожжей, которые могут использоваться для получения предложенных композиций, таких как DD, включают дрожжи рода *Saccharomyces*, *Pichia*, *Actinomyces* и *Kluveromyces*. Дрожжевые векторы обычно содержат начало репликации последовательности из дрожжевой плазмиды 2mu, автономно реплицирующуюся последовательность (ARS), промоторную область, последовательности полиаденилирования, последовательности терминации транскрипции и селективный маркерный ген. Примеры промоторных последовательностей в дрожжевых экспрессионных конструкциях включают промоторы металлотioneина, 3-фосфоглицераткиназы (Hitzeman, J. Biol. Chem. 255: 2073 (1980)) и других гликолитических ферментов, таких как енолаза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, гексокиназа, пируватдекарбоксилаза, фосфофруктокиназа, глюкозо-6-фосфатизомераза, 3-фосфоглицератмутаза, пируваткиназа, триозофосфатизомераза, фосфоглюкозоизомераза и глюкокиназа. Дополнительные подходящие векторы и промоторы для применения в дрожжевой экспрессии, а также методики трансформации дрожжей известны в данной области. См., например, Fleer, Gene 107: 285-195 (1991) и Hinnen, PNAS 75: 1929 (1978).

[0386] Системы культур клеток-хозяев на основе клеток насекомых и растений также могут применяться для получения композиций, охватываемых настоящим изобретением. Такие системы клеток-хозяев включают, например, системы клеток насекомых, инфицированные рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, бакуловирусными), содержащими кодирующую последовательность DD; системы растительных клеток, инфицированные рекомбинантными вирусными векторами

экспрессии (например, на основе вируса мозаики цветной капусты, CaMV; вируса табачной мозаики, TMV) или трансформированные рекомбинантными плазмидными векторами экспрессии (например, Ti-плазмидой), содержащими кодирующую последовательность DD, включая, без ограничения, системы экспрессии, раскрытые в пат. США 6,815,184; публ. США 60/365769 и 60/368047; и WO04/057002, WO04/024927 и WO03/078614; содержание которых полностью включено в настоящее описание путем ссылки.

[0387] В дополнительном варианте осуществления могут использоваться системы клеток-хозяев, включающие системы клеток животных, инфицированные рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, аденовирусами, ретровирусами, аденоассоциированными вирусами, вирусами герпеса, лентивирусами), включая сконструированные клеточные линии, содержащие множественные копии ДНК, кодирующей DDpp, либо стабильно амплифицирующиеся (CHO/dhfr), либо нестабильно амплифицирующиеся в двойных микрохромосомах (например, линиях мышинных клеток). В одном варианте осуществления вектор, содержащий полинуклеотид(ы), кодирующий DDpp, является полицистронным. Примеры клеток млекопитающих, подходящих для получения этих композиций, включают клетки 293 (например, 293T и 293F), клетки CHO, клетки ВНК, клетки NS0, клетки SP2/0, клетки миеломы YO, клетки миеломы мыши P3X63, клетки PER, PER.C6 (Crucell, Netherlands), клетки VERY, клетки Hela, клетки COS, клетки MDCK, клетки 3T3, клетки W138, клетки BT483, клетки Hs578T, клетки HTB2, клетки BT20, клетки T47D, клетки CRL7030, клетки HsS78Bst, клетки гибридом и другие клетки млекопитающих. Дополнительные примеры клеток-хозяев млекопитающих, которые могут использоваться при практической реализации предложенных вариантов осуществления, включают, без ограничения, Т-клетки. Некоторые примеры систем экспрессии и методов селекции описаны в следующих источниках и цитируемых в них ссылках: Borth et al., *Biotechnol. Bioen.* 71(4): 266-73 (2000), in Werner et al., *Arzneimittel-forschung/Drug Res.* 48(8): 870-80 (1998), Andersen et al., *Curr. Op. Biotechnol.* 13: 117-123 (2002), Chadd et al., *Curr. Op. Biotechnol.* 12: 188-194 (2001), and Giddings, *Curr. Op. Biotechnol.* 12: 450-454 (2001). Дополнительные примеры систем экспрессии и методов селекции описаны в Logan et al., *PNAS* 81: 355-359 (1984), Birtner et al., *Methods Enzymol.* 153: 51-544 (1987)). Последовательности контроля транскрипции и трансляции для векторов экспрессии в клетках млекопитающих часто происходят из вирусных геномов. Обычно используемые промоторные последовательности и энхансерные последовательности в векторах экспрессии млекопитающих включают последовательности, полученные из вируса полиомы, аденовируса 2, вируса обезьян 40 (SV40) и цитомегаловируса человека (ЦМВ). Примеры коммерческих векторов экспрессии для применения в клетках-хозяевах млекопитающих включают pCER4 (Invitrogen) и pcDNA3 (Invitrogen).

[0388] Физические способы введения нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина (например, клетку-хозяина млекопитающего) включают осаждение фосфатом кальция, липофекцию, бомбардировку частицами, микроинъекцию, электропорацию и т.п. Способы получения клеток, включающих векторы и/или экзогенные нуклеиновые кислоты, хорошо

известны из уровня техники. См., например, Sambrook *et al.* (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York).

[0389] Биологические способы введения представляющего интерес полинуклеотида в клетку-хозяина включают применение ДНК и РНК векторов. Вирусные векторы, и особенно ретровирусные векторы, стали наиболее широко используемым методом введения генов в клетки млекопитающих (например, человека). Другие вирусные векторы могут быть получены на основе лентивирусов, поксвирусов, вируса простого герпеса I, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов и т.п. См., например, пат. США 5,350,674 и 5,585,362, содержание каждого из которых полностью включено в настоящее описание путем ссылки.

[0390] Способы введения представляющих интерес ДНК и РНК полинуклеотидов в клетку-хозяина включают электропорацию клеток, при которой к клеткам прикладывают электрическое поле, чтобы увеличить проницаемость клеточной мембраны, что позволяет химическим веществам, лекарственным средствам или полинуклеотидам проникать в клетку. Содержащие DDrp конструкции ДНК или РНК можно вводить в клетки млекопитающих или прокариотические клетки с помощью электропорации.

[0391] Химические средства для введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают коллоидные дисперсионные системы, такие как комплексы макромолекул, нанокапсулы, микросферы, гранулы и системы на основе липидов, включая эмульсии типа масло в воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Примером коллоидной системы для применения в качестве средства доставки *in vitro* и *in vivo* является липосома (например, искусственная мембранная везикула). В случае использования невирусной системы доставки примером средства доставки является липосома. Применение липидных составов предполагается для введения нуклеиновых кислот в клетку-хозяина (*in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*). В другом аспекте нуклеиновая кислота может быть ассоциирована с липидом. Нуклеиновая кислота, ассоциированная с липидом, может быть инкапсулирована в водную внутреннюю часть липосомы, распределена в липидном бислое липосомы, прикреплена к липосоме посредством связывающей молекулы, которая соединена как с липосомой, так и с олигонуклеотидом, заключена в липосому, связана в комплексе с липосомой, диспергирована в растворе, содержащем липид, смешана с липидом, объединена с липидом, может содержаться в виде суспензии в липиде, содержаться или связана в комплексе с мицеллой или иным образом ассоциирована с липидом. Композиции, ассоциированные с липидом, липидом/ДНК или липидом/вектором экспрессии, не ограничиваются какой-либо конкретной структурой в растворе. Например, они могут присутствовать в бислоидной структуре в виде мицелл или в "коллапсированной" структуре. Они могут быть также просто распределены в растворе с возможностью образования агрегатов, неоднородных по размеру и форме. Липиды представляют собой жирные вещества, которые могут быть природными или синтетическими липидами. Например, липиды включают жировые капли, которые обычно присутствуют в цитоплазме, а также класс соединений, которые содержат длинноцепочечные алифатические углеводороды и их производные, такие как жирные

кислоты, спирты, амины, аминоспирты и альдегиды.

[0392] Липиды, подходящие для применения, могут быть получены из коммерческих источников. Например, димиристоилфосфатидилхолин ("DMPC") можно приобрести в Sigma, St. Louis, MO; дицетилфосфат ("DCP") можно приобрести в K&K Laboratories (Plainview, NY); холестерин ("Chol") можно приобрести в Calbiochem-Behring; димиристоилфосфатидилглицерин ("DMPG") и другие липиды можно приобрести в Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL). Стоковые растворы липидов в хлороформе или хлороформе/метаноле можно хранить при температуре приблизительно -20°C . Хлороформ может использоваться в качестве единственного растворителя, поскольку он более летучий, чем метанол. "Липосома" - общий термин, охватывающий множество одно- и многослойных липидных носителей, образующихся в результате образования замкнутых липидных бислоев или агрегатов. Липосомы можно охарактеризовать как имеющие везикулярные структуры с бислоевой фосфолипидной мембраной и внутренней водной средой. Мультиламеллярные липосомы имеют несколько липидных слоев, разделенных водной средой. Они образуются спонтанно при суспендировании фосфолипидов в избытке водного раствора. Липидные компоненты подвергаются самоперестройке перед образованием закрытых структур и захватывают воду и растворенные вещества между липидными бислоями (Ghosh et al., *Glycobiology* 5: 505-510 (1991)). Впрочем, также охвачены композиции, которые имеют в растворе другую структуру, отличающуюся от нормальной везикулярной структуры. Например, липиды могут принимать мицеллярную структуру или просто существовать в виде неоднородных агрегатов липидных молекул. Также рассматриваются комплексы липофектамина-нуклеиновой кислоты.

[0393] Независимо от способа, используемого для введения экзогенных нуклеиновых кислот в клетку-хозяина, присутствие последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине может быть легко подтверждено с помощью различных анализов, известных в уровне техники. Такие анализы включают, например, "молекулярно-биологические" анализы, известные в данной области, такие как Саузерн- и Нозерн-блоттинг, ОТ-ПЦР и ПЦР; "биохимические" анализы, такие как обнаружение присутствия или отсутствия конкретного пептида, например, с помощью иммунологических методов (ИФА и Вестерн-блоттинг) или с помощью анализов, описанных в настоящем изобретении, для идентификации средств, включенных в объем представленных вариантов осуществления.

[0394] Репортерные гены используются для идентификации потенциально трансфицированных клеток и для оценки функциональности регуляторных последовательностей. Как правило, репортерный ген представляет собой ген, который не присутствует и не экспрессируется в реципиентном организме, ткани или клетке и который кодирует полипептид, экспрессия которого проявляется каким-либо легко обнаруживаемым свойством, например, ферментативной активностью. Экспрессию репортерного гена исследуют в подходящее время после введения ДНК в клетки-реципиенты. Неограничивающий список подходящих репортерных генов может включать

гены, кодирующие люциферазу, бета-галактозидазу, хлорамфениколацетилтрансферазу, секретируемую щелочную фосфатазу или ген зеленого флуоресцентного белка (например, Ui-Tei et al., FEBS Lett. 479: 79-82 (2000)). Подходящие системы экспрессии известны в уровне техники и могут быть получены при использовании известных методов или приобретены на рынке. Как правило, конструкция с минимальной 5'-фланкирующей областью, показывающей наиболее высокий уровень экспрессии репортерного гена, идентифицируется как промотор. Такие промоторные области обычно можно соединять с репортерным геном и использовать для оценки способности средств модулировать направляемую промотором транскрипцию.

[0395] Ряд систем селекции может использоваться в системах клеток млекопитающих-векторов экспрессии, включающие, без ограничения, гены тимидинкиназы вируса простого герпеса, гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы и аденинфосфорибозил-трансферазы (Lowy et al., Cell 22: 817 (1980)), которые могут использоваться в tk⁻, hgprt⁻ или aprt⁻ клетках соответственно. Кроме того, устойчивость к антиметаболитам может использоваться в качестве основного механизма селекции, например, для систем dhfr, gpt, neo, hygro, trpB, hisD, ODC (орнитиндекарбоксилазы) и глутаминсинтазы.

[0396] После получения DDpp (например, Адаптера) в результате рекомбинантной экспрессии его можно очищать любым способом, известным в уровне техники для очистки рекомбинантного белка, например, с помощью хроматографии (например, ионнообменной, гидрофобного взаимодействия, аффинной и эксклюзионной колоночной хроматографии), центрифугирования, дифференциальной растворимости или любого другого стандартного метода очистки белков. В дополнительных вариантах осуществления DDpp необязательно слит с гетерологичными полипептидными последовательностями (например, FLAG-меткой или HIS-меткой), описанными в настоящем изобретении или иным образом известными из уровня техники, для облегчения очистки. В частности, предполагается, что для аффинной очистки используются лиганды (например, антитела и другие аффинные матрицы), и что необязательно компонент композиции слитого DDpp (например, Адаптер), который связывается этими лигандами (например, FLAG-меткой или HIS-меткой), удаляется из композиции перед окончательным изготовлением DDpp с применением способов, известных в данной области.

В. Экспрессия CAR-рецепторов

[0397] CAR-рецепторы (например, CAR-рецепторы, включающие внеклеточный D-домен, раскрытый в настоящем изобретении или внеклеточный p26) специально ассоциированы с клеткой и используются в отношении клетки, в которой они экспрессируются. Один конкретный вариант осуществления относится к стратегии адоптивного клеточного переноса Т-клеток, трансдуцированных для экспрессии CAR. Предпочтительно клетка может быть генетически модифицирована для стабильной экспрессии CAR на своей поверхности, что придает новую специфичность к мишени, независимую от МНС.

[0398] Различные векторы, полученные из вирусов, можно использовать в приложениях, в которых вирусы используются для трансфекции и интеграции в геном клеток млекопитающих. Вирусы, которые могут использоваться в качестве векторов, включают, без ограничения, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса и лентивирусы. Лентивирусные векторы наиболее подходят для достижения долговременного переноса генов (например, адоптивной Т-клеточной иммунной терапии), поскольку они обеспечивают долговременную, стабильную интеграцию трансгена и его воспроизведение в дочерних клетках. Лентивирусные векторы обладают дополнительным преимуществом перед векторами, полученными на основе онко-ретровирусов, таких как вирусы мышинного лейкоза, поскольку они могут трансдуцировать непролиферирующие клетки, такие как гепатоциты. Они также обладают дополнительным преимуществом низкой иммуногенности. Как правило, подходящий вектор содержит точку начала репликации, функциональную по меньшей мере в одном организме, промоторную последовательность, удобные сайты эндонуклеаз рестрикции и один или более селективных маркеров (например, публ. междунар. заявок WO 01/96584 и WO 01/29058 и патент США 6,326,193). Для экспрессии трансгенов доступны несколько последовательностей векторных промоторов. Одним из примеров подходящего промотора является последовательность предраннего промотора цитомегаловируса (ЦМВ). Эта промоторная последовательность представляет собой сильную конститутивную промоторную последовательность, способную направлять высокие уровни экспрессии любой полинуклеотидной последовательности, функционально связанной с ней. Другим примером подходящего промотора является EF-1a. Однако могут использоваться и другие конститутивные промоторные последовательности, в том числе, без ограничения, ранний промотор вируса обезьян 40 (SV40), вирус опухоли молочной железы мышей (MMTV), промотор длинного концевой повтора (LTR) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), промотор MoMuLV, промотор вируса лейкоза птиц, предранний промотор вируса Эпштейна-Барр, промотор вируса саркомы Рауса, а также промоторы генов человека, такие как, без ограничения, промотор актина, промотор миозина, промотор гемоглобина и промотор креатинкиназы. Индуцируемые промоторы включают, без ограничения перечисленными, промотор металлотioneина, глюкокортикоидный промотор, прогестероновый промотор и тетрациклиновый промотор.

[0399] Чтобы оценить экспрессию полипептида CAR или его частей, вектор экспрессии, введенный в клетку, также может содержать либо селективный маркерный ген и/или репортерный ген для облегчения идентификация и отбора экспрессирующих клеток из популяции клеток, которые пытались трансфицировать или инфицировать вирусными векторами. В других аспектах селективный маркер может находиться на отдельном участке ДНК и использоваться в процедуре котрансфекции. Как селективные маркеры, так и репортерные гены могут быть фланкированы соответствующими регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии в клетках-хозяевах. Подходящие селективные маркеры включают, например, гены устойчивости к антибиотикам, такие как

нео, а также другие гены устойчивости, известные в уровне техники.

[0400] Перед экспансией и генетической модификацией Т-клеток согласно изобретению источник Т-клеток получают у субъекта. Т-клетки могут быть получены из различных источников, включающих мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, ткань тимуса, ткань из участка инфекции, асцитную жидкость, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли. В некоторых вариантах осуществления, представленных в настоящем изобретении, может использоваться любое количество линий Т-клеток, доступных в данной области.

[0401] Полное обсуждение способов выделения, культивирования, активации и размножения Т-клеток можно найти в заявке WO 2012079000, содержание которой полностью включено в настоящее описание путем ссылки.

[0402] Дополнительно предложена клетка-хозяин, включающая нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR, описанный в настоящем изобретении. Кроме того, предложена композиция, включающая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR.

[0403] В предпочтительном варианте осуществления электропорация клеток приводит к экспрессии DDpp-CAR на поверхности Т-клеток, НК-клеток и/или НКТ-клеток. Такая экспрессия может быть транзientной или стабильной в течение жизни клетки. Электропорация может быть выполнена с помощью методов, известных в данной области, включая системы трансфекции MaxCyte GT® и STX® (MaxCyte, Gaithersburg, MD, USA).

[0404] В некоторых вариантах осуществления экспрессия CAR, раскрытого в настоящем изобретении, приводит к получению клеточноассоциированных композиций. В некоторых вариантах осуществления CAR включает мишень-связывающий домен, включающий DD, раскрытый в настоящем изобретении (например, DD, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8-33 или 74-94). В некоторых вариантах осуществления DD связывает CD123 и включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления CD123-специфичный DD включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления CD123-специфичный DD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления DD связывает p26 АФП и включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В некоторых вариантах осуществления DD связывает p26 АФП и включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70-73 или 92-94. В некоторых вариантах осуществления DD связывает p26 АФП и включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73. В некоторых вариантах осуществления CAR включает внеклеточную AD, включающую p26. В некоторых вариантах осуществления внеклеточная AD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO 37-43 или 44.

С. Химический синтез DDpp

[0405] В дополнение к рекомбинантным методам получение DDpp (например, Адаптера) также можно производить с использованием органического химического синтеза

требуемого полипептида с применением множества жидкофазных и твердофазных химических процессов, известных из уровня техники. Различные автоматические синтезаторы доступны в продаже и могут использоваться в соответствии с известными методиками. См., например, Tam *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 105: 6442 (1983); Merrifield, Science 232: 341-347 (1986); Barany and Merrifield, The Peptides, Gross and Meienhofer, eds, Academic Press, New York, 1-284; Barany *et al.*, Int. J. Pep. Protein Res. 30: 705-739 (1987); Kelley *et al.* в Genetic Engineering Principles and Methods, Setlow, J. K., ed. Plenum Press, NY. 1990, vol. 12, pp. 1-19; Stewart *et al.*, Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, 1989. Одним из преимуществ этих методик является то, что они позволяют включать в последовательность DDpp остатки неприродных аминокислот.

[0406] DDpp (например, Адаптер), которые применяются в способах, описанных в настоящем изобретении, могут быть модифицированы во время или после синтеза или трансляции, например, путем гликозилирования, ацетилирования, бензилирования, фосфорилирования, амидирования, пэгилирования, формилирования, дериватизации с использованием известных защитных/блокирующих групп, протеолитического расщепления, связывания с молекулой антитела, гидроксирования, иодирования, метилирования, миристоилирования, окисления, пэгилирования, протеолитического процессинга, фосфорилирования, пренилирования, рацемизации, селеноилирования, сульфатирования, убиквитинирования и т.д. (см., например, Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties, 2d Ed. (W.H. Freeman and Co., N.Y., 1992); Postranslational Covalent Modification of Proteins, Johnson, ed. (Academic Press, New York, 1983), pp. 1-12; Seifter, Meth. Enzymol. 182: 626-646 (1990); Rattan, Ann. NY Acad. Sci. 663: 48-62 (1992)). В конкретных вариантах осуществления пептиды ацетилированы на N-конце и/или амидированы на C-конце.

[0407] Настоящее изобретение также относится к производным DDpp (например, Адаптеру) и включает полипептиды, которые были химически модифицированы каким-либо образом, отличающимся от вставки, делеции или замены аминокислот. В этом случае DDpp химически связан с полимерами, липидами, другими органическими молекулами и/или неорганическими молекулами. Примеры модификаций полипептидов представлены в Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press, (1996). DDpp обязательно включает функциональную группу, которая облегчает конъюгирование с другой молекулой (например, пептидным фрагментом). Примеры функциональных групп включают, без ограничения перечисленными, изотиоцианат, изоцианат, ацилазид, сложный NHS эфир, сульфонилхлорид, альдегид, эпоксид, оксиран, карбонат, арилирующий агент, имидоэфир, карбодиимид, ангидрид, производные алкилгалогенидов (например, галогенацетильные производные), малеимид, азиридин, производные акрилоила, арилирующие агенты, реагенты тиол-дисульфидного обмена (например, пиридилдисульфиды или TNB тиол), диазоалкан, карбоилдиимадазол, N, N'-дисулцинилкарбонат, N-гидроксисукцинимидилхлорформиат и производные гидразина. Малеимид может использоваться, например, для создания DDpp, который связывает альбумин *in vivo*.

[0408] В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, адаптер) ковалентно модифицирован для включения одной или более присоединенных молекул водорастворимого полимера. Водорастворимый полимер (или другую химическую молекулу) присоединяют к любому аминокислотному остатку, хотя в некоторых вариантах осуществления предпочтительным является присоединение к N- или C-концу. Подходящие полимеры включают, без ограничения, ПЭГ (например, ПЭГ размером приблизительно 40 кДа, 30 кДа, 20 кДа, 10 кДа, 5 кДа или 1 кДа), полиоксиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, монометоксиполиэтиленгликоль, декстран, гидроксипропилоккрахмал, целлюлозу, поли-(N-винилпирролидон)-полиэтиленгликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимер полипропиленоксида и этиленоксида, полисиаловую кислоту (PSA), полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин) и поливиниловый спирт, а также смеси любых из вышеперечисленных. В одном варианте осуществления DDpp является ПЭГилированным. Молекулы ПЭГ доступны в различных формах, например, линейных или разветвленных. По поводу дальнейшего обсуждения присоединяемых водорастворимых полимеров см. патенты США 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 и 4,179,337. Другие молекулы, подходящие для улучшения полупериода существования или стабильности пептида, описаны в настоящем изобретении и включают, например, альбумин (необязательно модифицированный для конъюгирования с DDpp), цепи жирных кислот (например, жирные кислоты C12-C18, такие как жирные кислоты C14 или дикарбоновые кислоты, такие как октадекандикарбоновая кислота (oddc)), антитело или его фрагмент (например, Fc-часть антитела) и пролин-аланин-сериновые мультимеры.

[0409] В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) конъюгирован с молекулой полиэтиленгликоля (ПЭГ), человеческим сывороточным альбумином (HSA), антителом или фрагментом антитела, гидроксипропилоккрахмалом, пролин-аланин-сериновым мультимером (PAS-илирование), C12-C18 жирной кислотой или полисиаловой кислотой.

[0410] В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) ацилирован по N-концевой аминокислоте пептида. В другом аспекте DDpp амидирован по C-концевой аминокислоте полипептида. В еще одном аспекте пептиды ацилированы по N-концевой аминокислоте пептида и амидированы по C-концевой аминокислоте пептида.

[0411] В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) включает одну или более модифицированных или непротеиногенных аминокислот или модифицированную линкерную группу (см., например, Grant, *Synthetic Peptides: A User's Guide*, Oxford University Press (1992)). Модифицированные аминокислоты включают, например, аминокислоты, в которых аминогруппа и/или карбоксильная группа заменена другой группой. Неограничивающие примеры включают модифицированные аминокислоты, включающие тиоамиды, мочевины, тиомочевины, ацилгидразиды, сложные эфиры, олефины, сульфонамиды, амиды фосфорной кислоты, кетоны, спирты, амиды бороновой кислоты, бензодиазепины и другие ароматические или неароматические гетероциклы (см. Estiarte *et al.*, *Burgers Medicinal Chemistry*, 6.sup.th edition, Volume 1, Part

4, John Wiley & Sons, New York (2002)). Непротеиногенные аминокислоты включают, без ограничения перечисленными, бета-аланин (Val), норвалин (Nva), норлейцин (Nle), 4-аминомасляную кислоту (гамма-Abu), 2-аминоизомасляную кислоту (Aib), 6-аминогексановую кислоту (эпсилон-Ahx), орнитин (Orn), гидроксипролин (Hyp), таурин, саркозин, цитруллин (Cit), цистеиновую кислоту (Coh), циклогексилаланин (Cha), метионинсульфоксид (Meo), метионинсульфон (Moo), гомосерин-метиловый сложный эфир (Hsm), пропаргилглицин (Eag), 5-фтортриптофан (5Fw), 6-фтортриптофан (6Fw), 3',4'-диметоксифенилаланин (Ear), 3',4'-дифторфенилаланин (Dff), 4'-фторфенилаланин (Pff), 1-нафтилаланин (1Ni), 2-нафтилаланин (2Ni), 1-метилтриптофан (1Mw), пеницилламин (Pen), гомосерин (Hse), т-бутилглицин, т-бутилаланин, фенилглицин (Phg), бензотиенилаланин (Bta), L-гомоцистеин (Hcy), N-метилфенилаланин (Nmf), 2-тиенилаланин (Thi), 3,3-дифенилаланин (Ebw), L-альфа-т-бутилглицин (Tle), Бра, гомофенилаланин (Hfe) и S-бензил-L-цистеин (Ece). Эти и другие непротеиногенные аминокислоты могут существовать в виде D- или L-изомеров. Примеры модифицированных линкеров включают, без ограничения ими, гибкий линкерный 4,7,10-триокса-1,13-тридекандиамин (Ttds), глицин, 6-аминогексановую кислоту, бета-аланин (Val), пентиновую кислоту (Pyn) и комбинации Ttds, глицина, 6-аминогексановой кислоты и Val.

[0412] Любая из многочисленных химических модификаций может быть выполнена известными методами, включая, без ограничения, ацетилирование, формилирование и т.д. Кроме того, производное может содержать одну или более неклассических аминокислот.

Клетки с химерным антигенным рецептором

[0413] Изобретение относится к композициям и способам регуляции специфичности и активности клеток, модифицированных для экспрессии одного или более различных CAR-рецепторов.

[0414] В некоторых вариантах осуществления клетки модифицированы для экспрессии одного или более CAR-рецепторов, описанных в настоящем изобретении. Такие CAR-содержащие клетки, называемые "CAR-клетками", находят применения в монотерапии и в комбинированной терапии, включающей другие терапевтические средства, таких как Адаптеры, описанные в настоящем изобретении, например, для уничтожения клетки-мишени.

[0415] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к клетке, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR включает D-домен, который связывается с CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления CAR включает аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 62-66 или 67. В некоторых вариантах осуществления CAR включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67. В некоторых вариантах осуществления клетка является иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является иммунной эффекторной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является Т-клеткой (CAR-Т-клеткой) или естественной киллерной (NK) клеткой (CAR-NK-клеткой). В некоторых вариантах осуществления клетка является аутологичной иммунной эффекторной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является аутологичной Т-клеткой (CAR-Т-клеткой) или аутологичной естественной киллерной (NK) клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является аллогенной иммунной эффекторной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является аллогенной Т-клеткой (CAR-Т-клеткой) или аллогенной естественной киллерной (NK) клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка, экспрессирующая CAR, способна направлять иммунный ответ против клетки, экспрессирующей CD123 в анализе *in vitro*.

[0416] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к клетке, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR включает домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с AD р26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления ADBД, который связывается с AD р26 АФП, включает scFv, который связывается с AD р26 АФП. В некоторых вариантах осуществления ADBД, который связывается с AD р26 АФП, включает D-домен, который связывается с AD р26 АФП. В некоторых вариантах осуществления AD р26 АФП включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-43 и 44. В некоторых вариантах осуществления AD р26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления AD р26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления DD, который связывается с р26 АФП, включает аминокислотную последовательность AD, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В некоторых вариантах осуществления DD, который связывается с р26 АФП, включает аминокислотную последовательность AD SEQ ID NO: 70-73 или 92-94. В некоторых вариантах осуществления DD, который связывается с AD р26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73. В некоторых вариантах осуществления CAR включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления CAR включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69. В некоторых вариантах осуществления клетка является иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является иммунной эффекторной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является Т-клеткой (CAR-Т-клеткой) или естественной киллерной (NK) клеткой (CAR-NK-клеткой). В некоторых вариантах осуществления клетка является аутологичной иммунной эффекторной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клеткой является аутологичной Т-клеткой (CAR-Т-

клеткой) или аутологичной естественной киллерной (NK) клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является аллогенной иммунной эффекторной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является аллогенной Т-клеткой (CAR-Т-клеткой) или аллогенной естественной киллерной (NK) клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка способна направлять иммунный ответ против клетки, экспрессирующей CD123, в анализе *in vitro*, включающем клетку, клетку, экспрессирующую CD123, и Адаптер, включающий: (1) D-домен, который связывается с CD123, и (b) AD p26 АФП, например, Адаптер, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50.

[0417] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к клетке, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR включает антигенную детерминанту (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-43 и 44. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления клетка является иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является иммунной эффекторной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является Т-клеткой (CAR-Т-клеткой) или естественной киллерной (NK) клеткой (CAR-NK-клеткой). В некоторых вариантах осуществления клетка является аутологичной иммунной эффекторной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клеткой является аутологичной Т-клеткой (CAR-Т-клеткой) или аутологичной естественной киллерной (NK) клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является аллогенной иммунной эффекторной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является аллогенной Т-клеткой (CAR-Т-клеткой) или аллогенной естественной киллерной (NK) клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка способна направлять иммунный ответ против клетки, экспрессирующей CD123, в анализе *in vitro*, включающем клетку, клетку, экспрессирующую CD123, и Адаптер, включающий: (1) D-домен, который связывается с CD123, и (b) D-домен, который связывает AD p26 АФП.

[0418] В некоторых вариантах осуществления CAR-клетка включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR, где CAR включает внеклеточный домен, состоящий, по меньшей мере частично, из ADBD (например, D-домена), который связывает представляющую интерес мишень, трансмембранного домена и сигнального домена. В нескольких вариантах осуществления кодируемый CAR-полипептид специфично связывается с опухолевым антигеном (и, таким образом, функционирует, доставляя клетку, экспрессирующую CAR, к опухоли). В нескольких вариантах осуществления опухолевый антиген, связываемый CAR, ассоциирован с гематологической злокачественной опухолью. В дополнительных вариантах осуществления опухолевый антиген, связываемый CAR, ассоциирован с солидной опухолью. В других вариантах осуществления CAR сконструирован для связывания

солидной и гематологической опухоли. В зависимости от варианта осуществления клетка, экспрессирующая CAR, может быть иммунной эффекторной клеткой (например, Т-клеткой или естественным киллером (NK-клеткой)) или клеткой другого типа. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка является аутологичной клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка является аллогенной клеткой. В нескольких вариантах осуществления клетка (Т-клетка, NK-клетка или клетка другого типа) демонстрирует противоопухолевый иммунитет, когда антигенсвязывающий домен CAR связывается со своим опухолевым антигеном (антигенами) мишенью.

[0419] В некоторых вариантах осуществления перед экспансией и генетической модификацией или другой модификацией источник клеток (например, Т-клеток или естественных киллеров) может быть обычным способом получен у субъекта при использовании методов, известных в данной области. Термин "субъект" предусматривает включение живых организмов, у которых может быть вызван иммунный ответ (например, млекопитающих). Т-клетки могут быть получены из источников, включающих, без ограничения, мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, ткань тимуса, ткань из участка инфекции, асцитную жидкость, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли.

[0420] В некоторых вариантах осуществления CAR-клетка способна уничтожать клетку-мишень, например, при взаимодействии ADBD (например, D-домена) CAR с AD, которая может присутствовать на поверхности клетки-мишени и/или в Адаптере. В некоторых вариантах осуществления CAR-клетка способна к дегрануляции, например, когда ADBD в CAR взаимодействует с AD, которая может присутствовать на поверхности клетки-мишени и/или в Адаптере. В некоторых вариантах осуществления CAR-клетка способна секретировать цитокин или цитокины, например, при взаимодействии ADBD CAR с AD, которая может присутствовать на поверхности клетки-мишени и/или в Адаптере.

[0421] В некоторых вариантах осуществления CAR-содержащая клетка является иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления CAR-содержащая клетка является иммунной эффекторной клеткой. В дополнительных вариантах осуществления CAR-содержащая иммунная клетка является цитотоксической клеткой. В дополнительных вариантах осуществления цитотоксическая клетка выбрана из Т-клетки, NK-клетки или культивируемой NK-клетки (например, клетки NK92). В некоторых вариантах осуществления иммунная CAR-клетка является аутологичной иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная CAR-клетка является аллогенной иммунной клеткой.

[0422] В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка включает поверхностный клеточный рецептор иммуноглобулина или другой пептидсвязывающей молекулы, такой как рецептор константной области иммуноглобулина, и включающий класс рецепторов, обычно называемых "Fc-рецепторами" ("FcR"). Ряд FcR структурно и/или функционально охарактеризованы и

известны в данной области, включая FcR, обладающие специфическими способностями взаимодействовать с ограниченной подгруппой изотипов тяжелой цепи иммуноглобулинов, или которые взаимодействуют с Fc-доменами с разной аффинностью и/или могут экспрессироваться на ограниченных подгруппах иммунных эффекторных клеток при некоторых условиях (например, Kijimoto-Ochichai et al., *Cell Mol. Life. Sci.* 59: 648 (2002); Davis et al., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 266: 85 (2002); Pawankar, *Curr. Opin. Allerg. Clin. Immunol.* 1: 3 (2001); Radaev et al., *Mol. Immunol.* 38: 1073 (2002); Wurzburg et al., *Mol. Immunol.* 38: 1063 (2002); Sulica et al., *Int. Rev. Immunol.* 20: 371 (2001); Underhill et al., *Ann. Rev. Immunol.* 20: 825 (2002); Coggeshall, *Curr. Dir. Autoimm.* 5: 1 (2002); Mimura et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* 495: 49 (2001); Baumann et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* 495: 219 (2001); Santoso et al., *Ital. Heart J.* 2: 811 (2001); Novak et al., *Curr. Opin. Immunol.* 13: 721 (2001); Fossati et al., *Eur. J. Clin. Invest.* 31: 821 (2001)), содержание которых полностью включено в настоящее описание путем ссылки.

[0423] Клетки, которые способны опосредовать ADCC, являются примерами иммунных эффекторных клеток. Другие иммунные эффекторные клетки включают естественные киллерные клетки, инфильтрирующие опухоль Т-лимфоциты (TIL), цитотоксические Т-лимфоциты и гранулоцитарные клетки, такие как клетки, которые включают механизмы аллергических реакций. Таким образом, иммунные эффекторные клетки включают, без ограничения, клетки гемопоэтического происхождения, в том числе клетки на разных стадиях дифференцировки в миелоидных и лимфоидных линиях, и которые могут (но не обязательно) экспрессировать один или более типов функциональных клеточных поверхностных FcR, такие как Т-лимфоциты, В-лимфоциты, NK-клетки, моноциты, макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы, базофилы, эозинофилы, тучные клетки, тромбоциты, эритроциты и предшественники, прогениторные клетки (например, гемопоэтические стволовые клетки), а также покоящиеся, активированные и зрелые формы таких клеток. Другие иммунные эффекторные клетки могут включать клетки негемопоэтического происхождения, которые способны опосредовать иммунные функции, например, эндотелиальные клетки, кератиноциты, фибробласты, остеокласты, эпителиальные клетки и другие клетки. Иммунные эффекторные клетки также могут включать клетки, которые опосредуют цитотоксические или цитостатические события, или эндоцитарные, фагоцитарные или пиноцитозные события, или вызывают индукцию апоптоза, или влияют на микробный иммунитет или нейтрализацию микробной инфекции, или клетки, которые опосредуют аллергические, воспалительные реакции или реакции гиперчувствительности и/или аутоиммунные реакции.

[0424] В некоторых вариантах осуществления CAR-содержащая клетка является Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления CAR-содержащая клетка является NK-клеткой. В дополнительных вариантах осуществления CAR-содержащая клетка является В-клеткой. Необязательно могут использоваться другие иммунные клетки и/или комбинации различных типов иммунных клеток. В некоторых вариантах осуществления иммунная CAR-клетка является аутологичной иммунной клеткой. В некоторых вариантах

осуществления иммунная CAR-клетка является аллогенной иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления комбинации типов клеток (например, НК-клеток и Т-клеток) являются предпочтительными, поскольку они действуют синергически при лечении заболевания или состояния (например, гиперпролиферативного заболевания, такого как рак). При использовании комбинаций различные типы клеток могут направленно взаимодействовать с одними и те же, разными или перекрывающимися опухолевыми антигенными детерминантами.

[0425] В некоторых вариантах осуществления CAR-содержащая иммунная клетка представляет собой Т-клетку, и связывание ADBD CAR с когнатным лигандом (т.е. представляющей интерес мишенью) стимулирует Т-клетку к инициации внутриклеточной сигнализации. В дополнительных вариантах осуществления связывание ADBD CAR с когнатным лигандом стимулирует Т-клетку к секреции цитокинов и дегрануляции, что приводит к цитотоксическому воздействию на клетку, экспрессирующую представляющую интерес мишень на своей поверхности (например, раковую клетку). В дополнительных вариантах осуществления CAR-содержащая Т-клетка пролиферирует в ответ на связывание с представляющей интерес мишенью. В некоторых вариантах осуществления активность CAR-содержащей Т-клетки не приводит к демонстрации Т-клетками фенотипа, связанного с истощением Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, где CAR-клетка представляет собой Т-клетку, трансмембранный домен CAR включает CD8a, 41BB или CD28, а цитоплазматический домен содержит альфа-, бета- или дзета-цепь Т-клеточного рецептора. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CD8a включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CD8a включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114.

[0426] В некоторых вариантах осуществления CAR-содержащая иммунная клетка представляет собой НК-клетку, трансмембранный домен включает CD8a, CD28 или 41BB, а цитоплазматический домен содержит дзета-цепь Т-клеточного рецептора. В некоторых вариантах осуществления цитоплазматический домен содержит последовательность SEQ ID NO: 115, 116 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления цитоплазматический домен содержит последовательность SEQ ID NO: 117. В некоторых вариантах осуществления иммунная CAR-клетка представляет собой аутологичную НК-клетку. В некоторых вариантах осуществления иммунная CAR-клетка представляет собой аллогенную НК-клетку.

[0427] В некоторых вариантах осуществления CAR-содержащая иммунная клетка была сконструирована для связывания с представляющей интерес мишенью, экспрессируемой раковой клеткой. В дополнительных вариантах осуществления CAR-содержащая клетка связывает опухолевый антиген, выбранный из группы: CD137, PDL1, CD123, CTLA4, CD47, KIR, DR5, TIM3, PD1, EGFR, TCR, CD19, CD20, CD22, ROR1, мезотелин, CD33, IL3Ra, cMet, PSMA, гликолипид F77, EGFRvIII, GD2, NY-ESO-1 и MAGE A3. В дополнительных вариантах осуществления CAR-содержащая клетка связывает 2, 3,

4, 5 или больше из указанных выше опухолевых антигенов.

[0428] В некоторых вариантах осуществления CAR-клетка сконструирована для экспрессии Адаптера, раскрытого в настоящем изобретении.

[0429] В дополнительных вариантах осуществления CAR-клетка сконструирована для экспрессии второго CAR. В некоторых вариантах осуществления второй CAR включает внеклеточный домен, содержащий ADBD (например, D-домен), трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен. В дополнительном варианте осуществления второй CAR состоит из внеклеточного домена, состоящего из одного или более ADBD с одинаковой или разной специфичностью. В некоторых вариантах осуществления второй CAR способен передавать сигнал эффекторной функции при связывании представляющей интерес мишени. В дополнительных вариантах осуществления второй CAR включает внеклеточный домен, содержащий ADBD, и трансмембранный или другой домен, ассоциированный с клеточной поверхностью, но не способен к сигнализации при связывании с представляющей интерес мишенью.

[0430] В некоторых вариантах осуществления CAR-клетка сконструирована таким образом, что последовательность, кодирующая CAR, сайт-специфически введена в локус гена, экспрессируемого на высоком уровне в соответствующей клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления кодирующую последовательность CAR вводят в локус Т-клеточного рецептора. В дополнительных вариантах осуществления кодирующую последовательность CAR вводят в α -константную цепь Т-клеточного рецептора (TRAC) клетки. Модифицированные клетки, в которых отсутствует экспрессия функционального TCR и/или HLA, могут быть получены стандартным способом при использовании любых подходящих средств, известных в данной области, включая, например, миРНК, мшРНК, CRISPR, TALEN и/или ZFN.

[0431] В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка может быть аллогенной иммунной эффекторной клеткой, например, Т-клеткой или НК-клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка может быть аутологичной иммунной эффекторной клеткой, например, Т-клеткой или НК-клеткой.

[0432] Получение CAR-клеток, включающих генетическую модификацию, полезную при практической реализации предложенных способов, можно проводить с использованием множества стандартных методик рекомбинантных ДНК, генетических манипуляций и редактирования генома, известных в уровне техники. Генетически модифицированные CAR-клетки, описанные в настоящем изобретении, в которых отсутствует экспрессия AD, могут быть получены стандартным способом с использованием любых подходящих средств, известных в данной области, в том числе, например, миРНК, мшРНК, CRISPR, TALEN и/или ZFN. Способы генетической манипуляции CAR-клетками описаны, например, в публ. заявки на пат. США 20170204372, которая полностью включена в настоящее описание путем ссылки.

[0433] В некоторых вариантах осуществления CAR-клетка сконструирована так, чтобы элиминировать или снижать экспрессию функционального Т-клеточного рецептора

(TCR) и/или человеческого лейкоцитарного антигена (HLA), например, HLA класса I и/или HLA класса II. Модифицированные клетки, в которых отсутствует экспрессия функционального TCR и/или HLA, могут быть получены обычным способом при использовании любых подходящих средств, известных в данной области, в том числе, например, миРНК, мшРНК, CRISPR, TALEN и/или ZFN.

[0434] В некоторых вариантах осуществления CAR-клетка сконструирована так, чтобы элиминировать или снижать экспрессию молекулы, которая может снижать способность CAR-клетки вызывать иммунный эффекторный ответ. В дополнительных вариантах осуществления клетка CAR сконструирована так, чтобы элиминировать или снижать экспрессию молекулы, выбранной из: PD1, PDL1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и TGFR бета. В некоторых вариантах осуществления CAR-клетка была сконструирована для элиминации или снижения экспрессии 2, 3, 4, 5 или более из вышеуказанных молекул. Модифицированные клетки, в которых отсутствует экспрессия одной или более из перечисленных выше молекул, могут быть получены обычным способом при использовании любых подходящих средств, известных в данной области, включая, например, миРНК, кшРНК, CRISPR, TALEN и/или ZFN.

[0435] В дополнительных вариантах осуществления CAR-клетка сконструирована так, чтобы элиминировать или снижать экспрессию одного или более из: (a) функционального TCR и HLA; и (b) молекулы, выбранной из: PD1, PDL1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и TGFR бета. В дополнительных вариантах осуществления CAR-клетка была сконструирована так, чтобы элиминировать или снижать экспрессию 2, 3, 4, 5, 6 или больше из вышеуказанных молекул.

[0436] CAR-клетки, подходящие для применения в сочетании с DDpp (например, Адаптером и CAR), раскрытым в настоящем изобретении, были раскрыты в публ. междунар. заявок WO 2016164305, WO 2016164308A1, WO 2019099440 и WO 2019099433, патентах США 10,662,248 и 10,647,775 и заявках на пат. США 20200223934 и 20210002381, которые включены в настоящее описание путем ссылки во всех отношениях.

Композиции

[0437] Изобретение относится к композициям, включающим полипептид D-домена и слитый белок DDpp (например, Адаптер), раскрытые в настоящем изобретении. Изобретение также относится к композициям, включающим клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), раскрытый в настоящем изобретении. Изобретение также относится к композициям, включающим полинуклеотид, кодирующий полипептид D-домена, слитый белок DDpp (например, Адаптер) или CAR, раскрытые в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления композиции, раскрытые в настоящем изобретении, представляют собой фармацевтические композиции. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции включают фармацевтически приемлемый наполнитель. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции включают физиологически переносимый носитель. В некоторых вариантах осуществления композиции, раскрытые в настоящем изобретении, подходят для введения пациенту,

например, путем внутривенного или подкожного введения.

[0438] В некоторых вариантах осуществления композиция, раскрытая в настоящем изобретении, включает клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR включает, D-домен, который связывается с CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления CAR включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62-66 или 67. В некоторых вариантах осуществления CAR включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67. В некоторых вариантах осуществления клетка является иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является иммунной эффекторной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является Т-клеткой (CAR-Т-клеткой) или естественной киллерной (NK) клеткой (CAR-NK-клеткой). В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка является аутологичной клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка является аллогенной клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка, экспрессирующая CAR, способна направлять иммунный ответ против клетки, экспрессирующей CD123, в анализе *in vitro*.

[0439] В некоторых вариантах осуществления композиция, раскрытая в настоящем изобретении, включает клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR включает домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с AD p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления ADBД, который связывается с AD p26 АФП, включает scFv, который связывается с AD p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления ADBД, который связывается с AD p26 АФП, включает D-домен, который связывается с AD p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-43 и 44. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления DD, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В некоторых вариантах осуществления DD, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70-73 или 92-94. В некоторых вариантах осуществления DD, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73. В некоторых вариантах осуществления CAR включает

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления CAR включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69. В некоторых вариантах осуществления клетка является иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является иммунной эффекторной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является Т-клеткой (CAR-Т-клеткой) или естественной киллерной (NK) клеткой (CAR-NK-клеткой). В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка является аутологичной иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка является аллогенной иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка способна направлять иммунный ответ против клетки, экспрессирующей CD123, в анализе *in vitro*, включающем клетку, клетку, экспрессирующую CD123, и Адаптер, включающий: (1) D-домен, который связывается с CD123, и (b) AD p26 АФП, например, Адаптер, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50.

[0440] В некоторых вариантах осуществления композиция, раскрытая в настоящем изобретении, включает клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR включает антигенную детерминанту (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-43 и 44. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления клетка является иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является иммунной эффекторной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является Т-клеткой (CAR-Т-клеткой) или естественной киллерной (NK) клеткой (CAR-NK-клеткой). В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка является аутологичной иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка является аллогенной иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка способна направлять иммунный ответ против клетки, экспрессирующей CD123, в анализе *in vitro*, включающем клетку, клетку, экспрессирующую CD123, и Адаптер, включающий: (1) D-домен, который связывается с CD123, и (b) D-домен, связывающий AD p26 АФП.

[0441] В некоторых вариантах осуществления композиция, раскрытая в настоящем изобретении, включает Адаптер, включающий: (a) D-домен (DD), который связывается с CD123, и (b) антигенную детерминанту (AD). В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах

осуществления Адаптер представляет собой моновалентный Адаптер, включающий один D-домен, который связывает CD123. В некоторых вариантах осуществления Адаптер представляет собой бивалентный Адаптер, включающий два D-домена, которые связывают CD123. В некоторых вариантах осуществления два D-домена, которые связывают CD123, являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления два D-домена, которые связывают CD123, являются разными. В некоторых вариантах осуществления Адаптер представляет собой бивалентный Адаптер, включающий первый D-домен, который связывает CD123, и второй D-домен, связывающий вторую AD. В некоторых вариантах осуществления вторая AD представляет собой CD33 или LeY. В некоторых вариантах осуществления моновалентный Адаптер включает D-домен, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления моновалентный Адаптер включает D-домен, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления бивалентный Адаптер включает DD, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления бивалентный Адаптер включает D-домен, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления бивалентный Адаптер включает два идентичных D-домена, включающих аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления бивалентный Адаптер включает два идентичных D-домена, включающих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает антигенную детерминанту (AD) p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-43 и 44. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления моновалентный Адаптер включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50-54 или 55. В некоторых вариантах осуществления моновалентный Адаптер включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления бивалентный Адаптер включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56-60 или 61. В некоторых вариантах осуществления моновалентный Адаптер включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает один или более линкеров. В некоторых вариантах осуществления Адаптер способен направлять иммунный ответ против клетки, экспрессирующей CD123, в анализе *in vitro*, включающем Адаптер, клетку, экспрессирующую CD123, и иммунную эффекторную клетку, экспрессирующую CAR, включающий ADBD, который связывает AD, которая включена в Адаптер, например, CAR, включающий D-домен, который связывает p26 АФП.

[0442] В некоторых вариантах осуществления композиция, раскрытая в настоящем

изобретении, включает Адаптер, включающий: (а) D-домен, который связывается с CD123, и (b) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывает AD p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-43 и 44. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления ADBD, который связывается с AD p26 АФП, включает D-домен, который связывается с AD p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 70-73 и 92-94. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает один или более линкеров. В некоторых вариантах осуществления Адаптер способен направлять иммунный ответ против клетки, экспрессирующей CD123, в анализе *in vitro*, включающем Адаптер, клетку, экспрессирующую CD123, и иммунную эффекторную клетку, экспрессирующую CAR, включающий AD p26 АФП.

[0443] В некоторых вариантах осуществления композиция, раскрытая в настоящем изобретении, включает Адаптер, включающий: (а) первый домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой-мишенью (AD) на клетке-мишени, и (b) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с AD p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-43 и 44. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления ADBD, который связывается с AD p26 АФП, включает D-домен, который связывается с p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 70-73 и 92-94. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает один или более линкеров. В некоторых вариантах осуществления Адаптер способен направлять иммунный ответ против клетки,

экспрессирующей CD123, в анализе *in vitro*, включающем Адаптер, клетку, экспрессирующую CD123, и иммунную эффекторную клетку, экспрессирующую CAR, включающий AD р26 АФП.

[0444] В некоторых вариантах осуществления CAR включает ADBD на основе одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv). В других вариантах осуществления CAR включает ADBD на основе связывающего домена с альтернативным каркасом (ASBD). В других вариантах осуществления CAR включает D-домен.

[0445] В некоторых вариантах осуществления CAR включает 2 ADBD. В других вариантах осуществления CAR включает ASBD и scFv. В других вариантах осуществления CAR включает D-домен и scFv. В некоторых вариантах осуществления CAR включает 2 ASBD. В других вариантах осуществления CAR включает 2 D-домена.

[0446] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен CAR является сигнальным доменом. В других вариантах осуществления внутриклеточный домен CAR включает основной сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен CAR включает основной сигнальный домен CD3 ζ . В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен CAR дополнительно включает костимулирующий сигнальный домен. В других вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен выбран из: CD28, 41BB, CD27 и CD134. В конкретных вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR включает костимулирующий сигнальный домен 41BB. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 115, 116 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 117.

[0447] В некоторых вариантах осуществления AD-мишень выбрана из: CD45, CD26, CD30, CD33, LeY и CD38. В некоторых вариантах осуществления AD-мишень выбрана из: CD19, CD22, CD123, BCMA, CS1, HER2, TACI, BAFFR и PDL1. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой BCMA. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой CS1. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой CD123. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой CD19. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой CD22. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой TACI. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой BAFFR. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой PDL1. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой HER2.

[0448] В некоторых вариантах осуществления CAR включает 2 ADBD, которые связываются с отдельными мишенями. В других вариантах осуществления CAR связывается с CD123 и CD33. В других вариантах осуществления CAR связывается с CD123 и CD38. В других вариантах осуществления CAR связывается с CD123 и LeY. В других вариантах осуществления CAR связывается с CD123 и BCMA. В других вариантах осуществления CAR связывается с CD123 и CS1. В других вариантах осуществления CAR

связывается с CD19 и CD123. В других вариантах осуществления CAR связывается с CD22 и CD123. В других вариантах осуществления CAR связывается с PDL1 и CD123.

[0449] В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает AD опухолевого антигена. В других вариантах осуществления опухолевый антиген выбран из группы: CD45, CD26, CD30, CD33 и CD38.

[0450] В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает AD опухолевого антигена. В других вариантах осуществления опухолевый антиген выбран из группы: BCMA, CD19, CD22, CS1, TACI, BAFFR и PDL1.

[0451] В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который представляет собой scFv. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который представляет собой ASBD. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает D-домен.

[0452] В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает два ADBD. В других вариантах осуществления Адаптер включает два ADBD, которые: (a) являются одинаковыми, (b) связываются с одной и той же антигенной детерминантой, (c) связываются с разными AD одного и того же антигена, (d) связывают с разными антигенами на одной и той же клетке, или (d) связываются с разными антигенами на разных клетках. В других вариантах осуществления Адаптер включает два ASBDs. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает два D-домена. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который представляет собой scFv, и ADBD, который представляет собой ASBD. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который представляет собой scFv, и ADBD, который представляет собой D-домен.

[0453] В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с элементом, выбранным из: CD45, CD26, CD30, CD33 и CD38. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD45. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD26. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD30. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD33. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD38. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD45.

[0454] В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с элементом, выбранным из: BCMA, CD123, CD19, CD22, CS1, HER2, TACI, BAFFR и PDL1. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с BCMA. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD123. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD19. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD22. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CS1. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с HER2. В других вариантах осуществления Адаптер включает

ADBD, который связывается с TAC1. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с BAFFR. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с PDL1.

[0455] В некоторых вариантах осуществления Адаптер является биспецифичным. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD123, и ADBD, который связывается с CD33. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD123, и ADBD, который связывается с CD38. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD123, и ADBD, который связывается с LeY. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с PDL1, и ADBD, который связывается с CD123.

[0456] В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является опухолевой клеткой. В других вариантах осуществления опухолевая клетка выбрана из группы, включающей клетку острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), клетку В-клеточного острого лимфобластного лейкоза, клетку волосатоклеточного лейкоза, клетку лимфомы Ходжкина, клетку миелодисплазии и клетку бластной плазмцитойдной дендритно-клеточной неоплазии (БПДКН). В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка является опухолевой клеткой ОМЛ. В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка является клеткой миелодисплазии. В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка является опухолевой клеткой В-клеточного острого лимфобластного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка является опухолевой клеткой волосатоклеточного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка является опухолевой клеткой лимфомы Ходжкина. В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка является опухолевой клеткой БПДКН. В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка экспрессирует CD123.

[0457] В способах уничтожения клетки-мишени, раскрытых в настоящем изобретении, клетка-мишень может быть клеткой иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления клеткой-мишенью является В-клетка. В некоторых вариантах осуществления клеткой-мишенью является Т-клетка. В некоторых вариантах осуществления клеткой-мишенью является интактная Т-клетка. В некоторых вариантах осуществления клеткой-мишенью является Т-клетка памяти.

[0458] В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является иммунной эффекторной клеткой. В других вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка является Т-клеткой. В других вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка является NK-клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка не является Т-клеткой или NK-клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка является аутологичной клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка является аллогенной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, убивает клетку-мишень. В некоторых вариантах осуществления связывание Адаптера с AD блокирует активность антигена, включающего AD. В некоторых вариантах осуществления

клетка, экспрессирующая CAR, включает генетическую модификацию, которая снижает или устраняет экспрессию AD, описанной в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, включает генетическую модификацию, которая снижает или устраняет экспрессию AD CD45 человека.

[0459] В некоторых вариантах осуществления CAR-клетка связывается с AD, присутствующей и на клетке-мишени, и на Адаптере. В других вариантах осуществления CAR-клетка связывается с AD, присутствующей на Адаптере, но не присутствующей на клетке-мишени. В некоторых вариантах осуществления AD является природным белком/молекулой. В некоторых вариантах осуществления AD является человеческим белком/молекулой.

[0460] В одном варианте осуществления терапевтические композиции, раскрытые в настоящем изобретении, содержат физиологически переносимый носитель вместе с по меньшей мере одним типом слитого белка DDpp (например, Адаптера), как описано в настоящем изобретении, растворенным или диспергированным в нем в качестве активного ингредиента. В другом варианте осуществления терапевтические композиции, раскрытые в настоящем изобретении, содержат физиологически переносимый носитель вместе с по меньшей мере одним типом DDpp, как описано в настоящем изобретении, растворенным или диспергированным в нем в качестве активного ингредиента. В другом варианте осуществления терапевтические композиции, раскрытые в настоящем изобретении, содержат физиологически переносимый носитель вместе с по меньшей мере одним типом CAR-клетки, как описано в настоящем изобретении, растворенным или диспергированным в нем в качестве активного ингредиента. В предпочтительном варианте осуществления терапевтическая композиция является неиммуногеной при введении пациенту-человеку в терапевтических целях.

[0461] Получение фармакологической композиции, которая содержит активные ингредиенты, растворенные или диспергированные в ней, хорошо известно в уровне техники. Как правило, такие композиции приготавливают в виде стерильных форм для инъекций, либо в виде жидких растворов, либо в виде суспензий, водных или неводных. Впрочем, также могут быть приготовлены твердые формы, подходящие для раствора или суспензий, в жидкости перед применением. Препарат также может быть эмульгирован. Таким образом, DDpp-содержащая (например, содержащая Адаптер) композиция может иметь форму растворов, суспензий, таблеток, капсул, составов с замедленным высвобождением или порошков, или других композиционных форм. В некоторых вариантах осуществления композиции DDpp (например, слитых белков DDpp, таких как Адаптеры) изготавливают, чтобы гарантировать или оптимизировать распределение *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) не пропускает многие высокогидрофильные соединения и при необходимости композиции приготавливают так, чтобы увеличить проход через ГЭБ, например, состав в липосомах. В отношении способов производства липосом см., например, пат. США 4,522,811, 5,374,548 и 5,399,331. Липосомы могут включать одну или более молекул, которые селективно транспортируются в

определенные клетки или органы, что улучшает направленную доставку лекарственных средств (см., например, Ranade, Clin. Pharmacol. 29: 685 (1989)).

[0462] DDpp (например, слитый белок DDpp, такой как Адаптер) и/или CAR-клетка могут быть смешаны с другими активными ингредиентами и/или эксципиентами, которые фармацевтически приемлемы и совместимы с активным ингредиентом, и в количествах, подходящих для применения в терапевтических способах, описанных в настоящем изобретении. Подходящими вспомогательными веществами являются, например, вода, раствор хлорида натрия, декстроза, глицерин, этанол и т.п., а также их комбинации. Кроме того, при необходимости композиция может содержать небольшие количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие вещества, pH-буферные вещества и т.п., которые повышают эффективность активного ингредиента.

[0463] Терапевтические составы DDpp (например, Адаптера) могут включать фармацевтически приемлемые соли компонентов, содержащихся в них. Фармацевтически приемлемые соли включают соли присоединения кислот (образованные со свободными аминогруппами полипептида), которые образованы с неорганическими кислотами, такими как, например, соляная или фосфорная кислоты, или такими органическими кислотами, как уксусная, винная, миндальная и т.п. Соли, образованные со свободными карбоксильными группами, также могут быть получены с неорганическими основаниями, такими как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа, и такими органическими основаниями, как изопропиламин, триметиламин, 2-этиламиноэтанол, гистидин, прокаин и т.п.

[0464] Физиологически переносимые носители известны из уровня техники. Примерами жидких носителей являются стерильные водные растворы, которые не содержат другие материалы кроме активных ингредиентов и воды, или содержат буфер, такой как фосфат натрия при физиологическом значении pH, физиологический раствор, или оба, например, фосфатно-солевой буферный раствор. Кроме того, водные носители могут содержать больше одной буферной соли, а также такие соли, как хлориды натрия и калия, декстрозу, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и другие растворенные вещества.

[0465] Жидкие композиции также могут содержать жидкие фазы в дополнение к воде или за исключением воды. Примерами таких дополнительных жидких фаз являются глицерин, растительные масла, такие как хлопковое масло, органические сложные эфиры, такие как этилолеат, и водно-масляные эмульсии.

[0466] В одном варианте осуществления терапевтическая композиция содержит слитый белок DDpp (например, Адаптер), обычно в количестве по меньшей мере 0,1 весового процента слитого белка DDpp на вес всей терапевтической композиции. Весовой процент представляет собой соотношение по весу слитого DDpp (например, Адаптера) на всю композицию. Так, например, 0,1 вес.% составляет 0,1 грамма DDpp (например, Адаптера) на 100 граммов всей композиции.

[0467] Терапевтическая композиция, содержащая слитый белок DDpp (например, содержащий Адаптер), обычно содержит от приблизительно 10 микрограмм (мкг) на

миллилитр (мл) до приблизительно 100 миллиграмм (мг) на мл слитого белка DDpp (например, Адаптера) в виде активного ингредиента на объем композиции и более предпочтительно содержит от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 10 мг/мл (т.е. от приблизительно 0,1 до 1 вес.%).

[0468] Диапазоны доз для введения DDpp (например, слитого белка DDpp, такого как Адаптер) являются достаточно большими для достижения требуемого эффекта, при котором симптомы заболевания, опосредованные молекулой-мишенью, уменьшаются. Доза не должна быть настолько большой, чтобы вызывать неблагоприятные побочные эффекты, такие как синдромы повышенной вязкости крови, отек легких, хроническую сердечную недостаточность и т.п. Как правило, доза будет изменяться в зависимости от возраста, состояния, пола и степени заболевания пациента и может быть определена специалистом в данной области. Дозу сможет скорректировать лечащий врач в случае возникновения каких-либо осложнений.

[0469] DDpp (например, слитый белок DDpp, такой как Адаптер) можно вводить парентерально путем инъекции или путем постепенной инфузии в течение времени. Хотя молекула-мишень обычно может стать доступной в организме при системном введении и поэтому чаще всего лечение проводят путем внутривенного введения терапевтических композиций, рассматриваются другие ткани и средства доставки, если существует вероятность того, что ткань-мишень содержит молекулу-мишень. Таким образом, DDpp (например, Адаптер) можно вводить внутривенно, внутривентриально, внутримышечно, подкожно, внутривентриально, чрескожно и можно доставлять перистальтическими средствами. Слитые белки DDpp (например, Адаптер) также можно доставлять в аэрозоле в дыхательные пути и легкие.

[0470] Терапевтические композиции, содержащие DDpp (например, Адаптер), традиционно можно вводить внутривенно, например, путем инъекции единичной дозы. Термин "единичная доза" при использовании в отношении терапевтической композиции, представленной в настоящем изобретении, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве однократной дозы для субъекта, при этом каждая единица содержит заданное количество активного материала, рассчитанное на получение требуемого терапевтического эффекта, в сочетании с требуемым разбавителем; например, носителем или несущей средой. В некоторых вариантах осуществления терапевтические композиции, содержащие DDpp (например, Адаптер), вводят подкожно.

[0471] DDpp (например, слитый белок DDpp, такой как Адаптер) вводят способом, совместимым с лекарственной формой, и в терапевтически эффективном количестве. Количество, подлежащее введению, зависит от субъекта, подлежащего лечению, способности системы субъекта использовать активный ингредиент вводимой композиции и степени желаемого терапевтического эффекта. Точные количества активного ингредиента, необходимые для введения, зависят от решения практикующего врача и индивидуальны для каждого лица. Однако подходящие диапазоны доз для системного применения раскрыты в настоящем изобретении и зависят от пути введения. Подходящие

схемы введения также варьируют, однако реализуются в типичном начальном введении с последующими повторными дозами с интервалом в один или более часов посредством последующей инъекции или другого введения. В альтернативе предусмотрена непрерывная внутривенная инфузия, достаточная для поддержания концентрации в крови в диапазонах, указанных для терапии *in vivo*.

[0472] Композиции DDrp (например, Адаптера) изготавливают, дозируют и вводят способом, соответствующим надлежащей медицинской практике. Факторы, рассматриваемые в этом контексте, включают конкретное заболевание, подлежащее лечению, конкретного млекопитающего, подлежащего лечению, клиническое состояние отдельного пациента, причину нарушения, место доставки средства, способ введения, подбор схемы введения и другие факторы, известные практикующим медработникам. Диапазоны доз для введения DDrp (например, Адаптера) являются достаточно большими для достижения требуемого эффекта, при котором симптомы заболевания, опосредованные молекулой-мишенью, уменьшаются. Доза не должна быть настолько большой, чтобы вызывать неблагоприятные побочные эффекты, такие как синдромы повышенной вязкости крови, отек легких, хроническая сердечная недостаточность и т.п. Как правило, доза изменяется в зависимости от возраста, состояния, пола и степени заболевания у пациента и может быть определена специалистом в данной области. Доза может быть скорректирована лечащим врачом в случае возникновения каких-либо осложнений.

[0473] Схема введения доз и количества, эффективные для терапевтического и профилактического применения, т.е. "схема применения", будет зависеть от множества факторов, включая причину, стадию и тяжесть заболевания или нарушения, состояние здоровья, физическое состояние, возраст млекопитающего, подвергаемого лечению, а также место и способ доставки DDrp (например, Адаптера). Терапевтическая эффективность и токсичность комплекса и состава могут быть определены с помощью стандартных фармацевтических, фармакологических и токсикологических методов на культурах клеток или экспериментальных животных. Данные, полученные в результате этих процедур, также могут использоваться при составлении диапазона доз для медицинского применения. Более того, терапевтический индекс (т.е. доза, терапевтически эффективная у 50 процентов группы, деленная на дозу, летальную для 50 процентов группы (ED50/LD50)) можно легко определить при использовании известных процедур. Дозировка предпочтительно находится в диапазоне концентраций, который включает ED50 с низкой токсичностью или без дозопонижающей токсичности, и может изменяться в этом диапазоне в зависимости от используемой лекарственной формы, чувствительности пациента и пути введения.

[0474] Схема применения также учитывает фармакокинетические и фармакодинамические параметры, известные в данной области, такие как скорость абсорбции лекарственного средства, биодоступность, метаболизм и клиренс (см., например, Hidalgo-Aragones, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 58: 611-617 (1996); Groning *et al.*, Pharmazie 51: 337-341 (1996); Fotherby, Contraception 54: 59-69 (1996); и Johnson *et al.*, J.

Pharm. Sci. 84: 1144-1146 (1995)). Определение схемы применения для каждого субъекта, подвергаемого лечению, вполне соответствует состоянию и уровню квалификации лечащего медработника. Более того, можно приходить однократное или многократное введение композиций DDpp (например, Адаптера) в зависимости от дозировки и частоты, как это необходимо и переносимо для субъекта. Продолжительность профилактического и терапевтического лечения будет изменяться в зависимости от конкретного заболевания или состояния, подвергаемого лечению. Некоторые заболевания поддаются интенсивному лечению, тогда как другие требуют длительной хронической терапии. DDpp (например, Адаптер) можно вводить последовательно или одновременно с дополнительным терапевтическим средством.

[0475] В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят в дозе от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 25 мг/кг, от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг, от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг.

[0476] В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят в дозе от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 25 мг/кг, от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг, от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят в дозе от приблизительно 1 мкг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 5 мкг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 10 мкг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 20 мкг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 50 мкг/кг до приблизительно 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят в дозе от приблизительно 10 мкг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от от приблизительно 50 мкг/кг до приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 100 мкг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 200 мкг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 500 мкг/кг до приблизительно 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят в дозе от приблизительно 100 мкг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 100 мкг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 100 мкг/кг до приблизительно 2 мг/кг, от приблизительно 100 мкг/кг до приблизительно 1 мг/кг, от приблизительно 100 мкг/кг до приблизительно 5 мг/кг или от приблизительно 100 мкг/кг до приблизительно 2 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят в дозе от приблизительно 1 мкг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 5 мкг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 10 мкг/кг до приблизительно 2 мг/кг, от приблизительно 20 мкг/кг до приблизительно 1 мг/кг или от приблизительно 5 мкг/кг до приблизительно 0,5 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят в дозе приблизительно 0,01 мг/кг, приблизительно 0,02 мг/кг, приблизительно 0,04 мг/кг,

дозе от приблизительно 0,2 мг до приблизительно 200 мг, от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 100 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 50 мг, от приблизительно 2 мг до приблизительно 25 мг или от приблизительно 2 мг до приблизительно 12 мг. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят в дозе приблизительно 0,4 мг, приблизительно 0,8 мг, приблизительно 1,6 мг, приблизительно 2,8 мг, приблизительно 3 мг, приблизительно 4 мг, приблизительно 8 мг, приблизительно 12 мг, приблизительно 16 мг, приблизительно 20 мг, приблизительно 24 мг, приблизительно 28 мг, приблизительно 40 мг или приблизительно 80 мг. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят в дозе приблизительно 1,6 мг, приблизительно 2,8 мг, приблизительно 3 мг, приблизительно 4 мг, приблизительно 8 мг, приблизительно 12 мг, приблизительно 16 мг или приблизительно 20 мг. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят подкожно. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

[0478] В некоторых вариантах осуществления вводят больше чем одну дозу DDpp (например, Адаптера). В некоторых вариантах осуществления больше чем одна доза DDpp (например, Адаптера) является постоянной дозой. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят в разных дозах. В некоторых вариантах осуществления вводимое количество DDpp (например, Адаптера) увеличивается в течение времени. В некоторых вариантах осуществления вводимое количество DDpp (например, Адаптера) уменьшается в течение времени. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) сначала вводят в низкой дозе от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 0,5 мг/кг, с последующим введением высокой дозы от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят подкожно. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

[0479] В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят ежедневно. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят два раза в день. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят три раза в день. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят четыре раза в день. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят каждые 12 часов. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят каждые 8 часов. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят каждые 6 часов. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят каждые 4 часа. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят через день. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят каждые три дня. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят два раза в неделю. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят два раза в неделю, например, в понедельник, в среду и в пятницу. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят еженедельно. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят подкожно. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

[0480] В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят в течение семи дней. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят в течение 2 недель. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят в течение 3 недель. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят в течение 4 недель. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят в течение 1 месяца. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят в течение 2 месяцев. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят в течение 3 месяцев. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят подкожно. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления DDpp

(например, Адаптер) включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

[0481] В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят с такой же частотой в течение периода лечения. В некоторых вариантах осуществления частота введения уменьшается в течение периода лечения. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) сначала вводят ежедневно в течение приблизительно одной недели, с последующим введением два раза в неделю. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) сначала вводят от одного до трех раз в день в течение приблизительно одной недели, с последующим ежедневным введением. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) сначала вводят от одного до трех раз в день в течение приблизительно недели, с последующим введением два раза в неделю или один раз в неделю. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят в виде непрерывной инфузии. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) сначала вводят в виде непрерывной инфузии в течение приблизительно одной недели, с последующим ежедневным введением. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) сначала вводят в виде непрерывной инфузии в течение приблизительно одной недели, с последующим введением два раза в неделю или один раз в неделю. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят подкожно. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

[0482] В некоторых вариантах осуществления от приблизительно 10×10^6 до приблизительно 300×10^6 клеток, экспрессирующих CAR, который специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, были введены субъекту, получающему DDpp (например, Адаптер). В некоторых вариантах осуществления от приблизительно 50×10^6 до приблизительно 900×10^6 клеток, экспрессирующих CAR, который специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, были введены субъекту, получающему DDpp (например, Адаптер). В некоторых вариантах осуществления от приблизительно 10×10^6 до приблизительно 500×10^6 клеток, экспрессирующих CAR, который специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, были введены субъекту, получающему DDpp (например, Адаптер). В некоторых вариантах осуществления приблизительно 100×10^6 клеток, экспрессирующих CAR, который специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, были введены субъекту, получающему DDpp (например, Адаптер). В некоторых вариантах осуществления приблизительно 50×10^6 клеток,

специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, включает D-домен, который специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, где D-домен необязательно включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70-73 или 92-94. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70 или 73. В некоторых вариантах осуществления CAR, который специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 или 69. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является иммунной эффекторной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является Т-клеткой (CAR-Т-клеткой) или естественной киллерной (NK) клеткой (CAR-NK-клеткой). В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующей CAR, не является Т-клеткой или NK-клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная CAR-клетка является аутологичной иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная CAR-клетка является аллогенной иммунной клеткой. Клетки, экспрессирующие CAR, раскрытые в настоящем изобретении, можно вводить отдельно или в виде фармацевтической композиции в комбинации с разбавителями и/или с другими компонентами, такими как химиотерапевтические средства, антитела, цитокины или популяции клеток. Композиции, раскрытые в настоящем изобретении, предпочтительно изготовлены для внутривенного введения, которое могут производить один или более раз. В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие CAR, вводят внутривенно.

[0483] В другом варианте осуществления DDpp (например, Адаптер) вводят в комбинации с одним или больше дополнительными терапевтическими средствами.

[0484] Терапевтически эффективное количество DDpp (например, слитого белка DDpp, такого как Адаптер) может быть количеством, которое при введении в физиологически переносимой композиции является достаточным для создания концентрации в плазме от приблизительно 0,1 микрограммов (мкг) на миллилитр (мл) до приблизительно 100 мкг/мл, предпочтительно от приблизительно 1 мкг/мл до приблизительно 5 мкг/мл, и обычно приблизительно 5 мкг/мл. Другими словами, доза может изменяться от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 300 мг/кг, предпочтительно от приблизительно 0,2 мг/кг до приблизительно 200 мг/кг, наиболее предпочтительно от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг, в одном или более введениях дозы ежедневно, в течение одного или более дней. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, Адаптер) включает D-домен,

который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

Применения

[0485] Мишень-связывающие DDpp, слитые белки DDpp, полинуклеотиды и клетки, раскрытые в настоящем изобретении, имеют применения, включающие диагностические и терапевтические применения. В некоторых вариантах осуществления DDpp, полинуклеотиды и клетки могут применяться в терапевтическом контексте, например, для лечения и/или диагностики заболевания или нарушения. Способы терапевтического лечения могут быть способами *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой рак (например, гематологическую злокачественную опухоль). В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой заболевание или нарушение иммунной системы, такое как воспаление или аутоиммунное заболевание.

[0486] Применение в качестве терапевтического средства является характерной особенностью специфичности связывания DDpp с мишенью. Включение DDpp в различные молекулярные композиции (например, слитые конструкции DD-антител, конъюгаты DD-лекарственного средства и DD-химерные рецепторы) обеспечивает применение при различных терапевтических показаниях и в способах действия, которые включают, без ограничения этим, растворимые и клеточноассоциированные композиции.

[0487] В одном варианте осуществления DDpp представляет собой растворимый слитый белок, состоящий из необязательной эпитопной метки и направляющего домена, который связывается с мишенью, которая ассоциирована с заболеванием или нарушением иммунной системы.

[0488] В некоторых вариантах осуществления DDpp, описанный в настоящем изобретении, может применяться для лечения рака. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения рака, который включает введение пациенту терапевтически эффективного количества DDpp (например, слитого DDpp).

[0489] В дополнительных вариантах осуществления изобретение относится к химерному антигенному рецептору (CAR), где CAR включает направляющий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления направляющий домен состоит, по меньшей мере частично, из мишень-связывающего DDpp, раскрытого в настоящем изобретении.

[0490] Способы, описанные выше и/или представленные в настоящем изобретении, описывают некоторые действия, предпринимаемые практикующим специалистом; однако нужно понимать, что они также могут включать инструкцию таких действий другой стороной. Таким образом, такие действия, как "введение Т-клетки, включающей мишень-специфичный связывающий полипептид-CAR", включают "инструкцию по введению Т-клетки, включающей мишень-специфичный связывающий полипептид-CAR".

А. Способы, включающие контакт клетки-мишени с CAR-клеткой.

[0491] В некоторых вариантах осуществления способ доставки иммунного ответа к

одной или более клеткам-мишеням включает контакт композиции, включающей клетку-мишень, с клеткой, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень экспрессирует CD123.

[0492] В некоторых вариантах осуществления способ уничтожения клетки-мишени включает контакт композиции, включающей клетку-мишень, с клеткой, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень экспрессирует CD123.

[0493] В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33.

[0494] В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен включает трансмембранный домен CD8a, 41BB или CD28. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен включает трансмембранный домен CD8a. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CD8a включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CD8a включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен выбран из группы, состоящей из домена альфа, бета или дзета-цепи T-клеточного рецептора человека; домена 41BB человека; домена CD28 человека; и их любой комбинации. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен включает внутриклеточный домен костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, 41BB, OX40, CD30, CD40, PD1, лимфоцитарного функционально-ассоциированного антигена 1 (LFA-1), CD2, CD7, DAP12, CBET, NKG2C, NKG2D, B7-H3, лиганда, который специфично связывается с CD83, и их любой комбинации. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит последовательность SEQ ID

NO: 115, 116 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 117.

[0495] В некоторых вариантах осуществления CAR, включающий D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62-66 или 67. В некоторых вариантах осуществления CAR, включающий D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах осуществления CAR, включающий D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления CAR, включающий D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления CAR, включающий D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления CAR, включающий D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66. В некоторых вариантах осуществления CAR, включающий D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67.

[0496] В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является иммунной эффекторной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является Т-клеткой (CAR-Т-клеткой) или естественной киллерной (NK) клеткой (CAR-NK-клеткой). В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, не является Т-клеткой или NK-клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная CAR-клетка является аутологичной иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная CAR-клетка является аллогенной иммунной клеткой.

[0497] В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является раковой клеткой, например, клеткой острого миелоидного лейкоза (ОМЛ). В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой миелодисплазии.

[0498] В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является опухолевой клеткой. В других вариантах осуществления опухолевая клетка выбрана из группы клетки острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), клетки В-клеточного острого лимфобластного лейкоза, клетки волосатоклеточного лейкоза, клетки лимфомы Ходжкина, клетки миелодисплазии и клетки бластной плазмцитойдной дендритно-клеточной неоплазии (БПДКН). В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка является опухолевой клеткой ОМЛ. В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка является клеткой миелодисплазии. В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка является опухолевой клеткой В-клеточного острого лимфобластного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка является опухолевой клеткой волосатоклеточного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка является опухолевой клеткой лимфомы Ходжкина. В некоторых вариантах осуществления

опухолевая клетка является опухолевой клеткой БПДКН. В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка экспрессирует CD123.

[0499] В способах уничтожения клетки-мишени, раскрытых в настоящем изобретении, клетка-мишень может быть клеткой иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является В-клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является интактной Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является Т-клеткой памяти.

[0500] Контакт может происходить *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. В одном варианте осуществления контакт происходит в организме пациента, например, пациента-человека.

[0501] Контакт может происходить *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение CAR-клетки пациенту.

В. Способы, включающие контакт клетки-мишени с Адаптером и/или CAR-клеткой.

[0502] В некоторых вариантах осуществления способ доставки иммунного ответа к клетке-мишени включает контакт композиции, включающей клетку-мишень, с Адаптером, где: (a) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает клетку, экспрессирующую CAR, где CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD) р26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) Адаптер включает: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD р26 АФП. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень экспрессирует CD123.

[0503] В некоторых вариантах осуществления способ доставки иммунного ответа к клетке-мишени включает контакт композиции, включающей клетку-мишень, с Адаптером, где: (a) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает клетку, экспрессирующую CAR, где CAR включает: (i) антигенную детерминанту (AD) р26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) Адаптер включает: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD) р26 АФП. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень экспрессирует CD123.

[0504] В некоторых вариантах осуществления способ доставки иммунного ответа к клетке-мишени включает контакт композиции, включающей клетку-мишень, с Адаптером, где: (a) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает клетку, экспрессирующую CAR, где CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD), отличной от CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) Адаптер включает: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD, связываемую CAR-рецептором. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень экспрессирует CD123.

[0505] В некоторых вариантах осуществления способ доставки иммунного ответа к клетке-мишени включает контакт композиции, включающей клетку-мишень, с Адаптером,

где: (a) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает клетку, экспрессирующую CAR, где CAR включает: (i) антигенную детерминанту (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) Адаптер включает: (i) первый домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с AD-мишенью, и (ii) второй домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень экспрессирует AD-мишень

[0506] В некоторых вариантах осуществления способ доставки иммунного ответа к клетке-мишени включает контакт композиции, включающей клетку-мишень, с клеткой, экспрессирующей CAR, где: (a) CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень экспрессирует CD123.

[0507] В некоторых вариантах осуществления способ доставки иммунного ответа к клетке-мишени включает контакт композиции, включающей клетку-мишень, с клеткой, экспрессирующей CAR, где: (a) CAR включает: (i) антигенную детерминанту (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень экспрессирует CD123.

[0508] В некоторых вариантах осуществления способ доставки иммунного ответа к клетке-мишени включает контакт композиции, включающей клетку-мишень, с клеткой, экспрессирующей CAR, где: (a) CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD), отличной от CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD, связываемую CAR-рецептором. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень экспрессирует CD123.

[0509] В некоторых вариантах осуществления способ доставки иммунного ответа к клетке-мишени включает контакт композиции, включающей клетку-мишень, с клеткой, экспрессирующей CAR, где: (a) CAR включает: (i) антигенную детерминанту (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает Адаптер, включающий: (i) первый домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с AD-мишенью, и (ii) второй домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень экспрессирует AD-мишень.

[0510] В некоторых вариантах осуществления способ уничтожения клетки-мишени включает контакт композиции, включающей клетку-мишень, с Адаптером, где: (a) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает клетку, экспрессирующую CAR, где CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) Адаптер включает: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень экспрессирует CD123.

[0511] В некоторых вариантах осуществления способ уничтожения клетки-мишени включает контакт композиции, включающей клетку-мишень, с Адаптером, где: (a) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает клетку, экспрессирующую CAR, где CAR включает: (i) антигенную детерминанту (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) Адаптер включает: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень экспрессирует CD123.

[0512] В некоторых вариантах осуществления способ уничтожения клетки-мишени включает контакт композиции, включающей клетку-мишень, с Адаптером, где: (a) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает клетку, экспрессирующую CAR, где CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD), отличной от CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) Адаптер включает: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD, связываемую CAR-рецептором. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень экспрессирует CD123.

[0513] В некоторых вариантах осуществления способ уничтожения клетки-мишени включает контакт композиции, включающей клетку-мишень, с Адаптером, где: (a) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает клетку, экспрессирующую CAR, где CAR включает: (i) антигенную детерминанту (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) Адаптер включает: (i) первый домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с AD-мишенью, и (ii) второй домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень экспрессирует AD-мишень

[0514] В некоторых вариантах осуществления способ уничтожения клетки-мишени включает контакт композиции, включающей клетку-мишень, с клеткой, экспрессирующей CAR, где: (a) CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень

экспрессирует CD123.

[0515] В некоторых вариантах осуществления способ уничтожения клетки-мишени включает контакт композиции, включающей клетку-мишень, с клеткой, экспрессирующей CAR, где: (a) CAR включает: (i) антигенную детерминанту (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень экспрессирует CD123.

[0516] В некоторых вариантах осуществления способ уничтожения клетки-мишени включает контакт композиции, включающей клетку-мишень, с клеткой, экспрессирующей CAR, где: (a) CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD), отличной от CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD, связываемую CAR-рецептором. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень экспрессирует CD123.

[0517] В некоторых вариантах осуществления способ уничтожения клетки-мишени включает контакт композиции, включающей клетку-мишень, с клеткой, экспрессирующей CAR, где: (a) CAR включает: (i) антигенную детерминанту (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает Адаптер, включающий: (i) первый домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с AD-мишенью, и (ii) второй домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень экспрессирует AD-мишень.

[0518] В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. в некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123,

включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33.

[0519] В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-43 и 44. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

[0520] В некоторых вариантах осуществления ADBD, который связывается с AD p26 АФП, включает scFv, который связывается с AD p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления ADBD, который связывается с AD p26 АФП, включает D-домен, который связывается с AD p26 АФП.

[0521] В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70-73 или 92-94. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73.

[0522] В некоторых вариантах осуществления CAR, включающий D-домен, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления CAR, включающий D-домен, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69.

[0523] В некоторых вариантах осуществления Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50-54 или 55. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56-60 или 61. В

включающий D-домен, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, а CAR, включающий D-домен, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

[0526] В некоторых вариантах осуществления AD-мишень выбрана из: CD45, CD26, CD30, CD33, LeY и CD38. В некоторых вариантах осуществления AD-мишень выбрана из: CD19, CD22, CD123, BCMA, CS1, HER2, TACI, BAFFR и PDL1. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой BCMA. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой CD45. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой CS1. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой CD123. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой CD19. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой CD22. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой TACI. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой BAFFR. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой PDL1. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой HER2.

[0527] В некоторых вариантах осуществления, где CAR включает ADBD, который связывается с AD, отличной от CD123, ADBD связывается с опухолевым антигеном. В других вариантах осуществления опухолевый антиген выбран из группы: CD45, CD26, CD30, CD33 и CD38. В других вариантах осуществления опухолевый антиген выбран из группы: BCMA, CD19, CD22, CS1, HER2, TACI, BAFFR и PDL1. В других вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой BCMA. В других вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой CD19.

[0528] В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является иммунной эффекторной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является Т-клеткой (CAR-Т-клеткой) или естественной киллерной (NK) клеткой (CAR-NK-клеткой). В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, не является Т-клеткой или NK-клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная CAR-клетка является аутологичной иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная CAR-клетка является аллогенной иммунной клеткой.

[0529] В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является раковой клеткой, например, клеткой острого миелоидного лейкоза (ОМЛ). В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой ОМЛ. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой миелодисплазии. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой В-клеточного острого лимфобластного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой

волосатоклеточного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой лимфомы Ходжкина. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой бластной плазматоидной дендритно-клеточной неоплазии (БПДКН). В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень экспрессирует CD123.

[0530] Контакт может происходить *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. В одном варианте осуществления контакт происходит в организме пациента, например, пациента-человека, например, после введения Адаптера пациенту, который уже получил клетку, экспрессирующую CAR, или после введения клетки, экспрессирующей CAR, пациенту, который уже получил Адаптер. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение Адаптера пациенту, которому ранее была введена клетка, экспрессирующая CAR.

[0531] В некоторых вариантах осуществления CAR включает ADBD на основе одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv). В других вариантах осуществления CAR включает ADBD на основе связывающего домена с альтернативным каркасом (ASBD). В других вариантах осуществления CAR включает D-домен.

[0532] В некоторых вариантах осуществления CAR включает 2 ADBD. В других вариантах осуществления CAR включает ASBD и scFv. В других вариантах осуществления CAR включает D-домен и scFv. В некоторых вариантах осуществления CAR включает 2 ASBD. В других вариантах осуществления CAR включает 2 D-домена.

[0533] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен CAR является сигнальным доменом. В других вариантах осуществления внутриклеточный домен CAR включает основной сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен CAR включает CD3 ζ основной сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен CAR дополнительно включает костимулирующий сигнальный домен. В других вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен выбран из: CD28, 41BB, CD27 и CD134. В конкретных вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный CAR домен включает костимулирующий сигнальный домен 41BB. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 115, 116 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 117.

[0534] В некоторых вариантах осуществления AD-мишень выбрана из: CD45, CD26, CD30, CD33 и CD38. В некоторых вариантах осуществления AD-мишень выбрана из: CD19, CD22, CD123, BCMA, CS1, HER2, TACI, BAFFR и PDL1. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой BCMA. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой CS1. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой CD123. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой CD19. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой CD22. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой TACI. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой BAFFR. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой PDL1. В других вариантах осуществления

AD-мишень представляет собой HER2.

[0535] В некоторых вариантах осуществления CAR включает 2 ADBD, которые связываются с отдельными мишенями. В других вариантах осуществления CAR связывается с CD19 и CD123. В других вариантах осуществления CAR связывается с BCMA и CD123. В других вариантах осуществления CAR связывается с CD22 и CD123. В других вариантах осуществления CAR связывается с PDL1 и CD123. В других вариантах осуществления CAR связывается с CD33 и CD123. В других вариантах осуществления CAR связывается с CD38 и CD123. В других вариантах осуществления CAR связывается с LeY и CD123.

[0536] В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает AD опухолевого антигена. В других вариантах осуществления опухолевый антиген выбран из группы: CD45, CD26, CD30, CD33 и CD38.

[0537] В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает AD опухолевого антигена. В других вариантах осуществления опухолевый антиген выбран из группы: BCMA, CD19, CD22, CS1, HER2, TACI, BAFFR и PDL1.

[0538] В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который представляет собой scFv. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который представляет собой ASBD. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает D-домен.

[0539] В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает два ADBD. В других вариантах осуществления Адаптер включает два ADBD, которые: (a) являются одинаковыми, (b) связываются с одной и той же антигенной детерминантой, (c) связываются с разными AD одного и того же антигена, (d) связываются с разными антигенами на одной и той же клетке или (e) связываются с разными антигенами на разных клетках. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает два ASBD. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает два D-домена. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который представляет собой scFv, и ADBD, который представляет собой ASBD. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который представляет собой scFv, и ADBD, который представляет собой D-домен.

[0540] В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с элементом, выбранным из: CD45, CD26, CD30, CD33 и CD38. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD45. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD26. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD30. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD33. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD38. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD45.

[0541] В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с элементом, выбранным из: BCMA, CD123, CD19, CD22, CS1, HER2, TACI,

BAFFR и PDL1. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с BCMA. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD123. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD19. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD22. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CS1. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с HER2. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с TACI. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с BAFFR. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с PDL1.

[0542] В некоторых вариантах осуществления Адаптер является биспецифичным. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD123, и ADBD, который связывается с CD33. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD123, и ADBD, который связывается с CD38. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD123, и ADBD, который связывается с LeY. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с PDL1, и ADBD, который связывается с CD123.

[0543] В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является опухолевой клеткой. В других вариантах осуществления опухолевая клетка выбрана из группы, включающей клетку острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), клетку В-клеточного острого лимфобластного лейкоза, клетку волосатоклеточного лейкоза, клетку лимфомы Ходжкина, клетку миелодисплазии и клетку бластной плазмоцитоидной дендритно-клеточной неоплазии (БПДКН). В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка является опухолевой клеткой ОМЛ. В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка является клеткой миелодисплазии. В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка является опухолевой клеткой В-клеточного острого лимфобластного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка является опухолевой клеткой волосатоклеточного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка является опухолевой клеткой лимфомы Ходжкина. В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка является опухолевой клеткой БПДКН. В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка экспрессирует CD123.

[0544] В способах уничтожения клетки-мишени, раскрытых в настоящем изобретении, клетка-мишень может быть клеткой иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является В-клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является интактной Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является Т-клеткой памяти.

[0545] В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является иммунной эффекторной клеткой. Иммунная эффекторная клетка является клеткой, которая участвует в иммунном ответе, например, в стимуляции иммунного

эффекторного ответа. Примеры иммунных эффекторных клеток включают Т-клетки (например, альфа/бета Т-клетки и гамма/дельта Т-клетки), В-клетки, естественные киллеры (НК-клетки), естественные Т-киллеры (НКТ-клетки), тучные клетки и фагоциты миелоидной линии. Иммунная эффекторная функция или иммунный эффекторный ответ являются функцией или ответом, например, иммунной эффекторной клетки, который усиливает или стимулирует иммунную атаку клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная функция или ответ относятся к свойству Т или НК-клетки, которое вызывает цитолиз или ингибирование роста или пролиферации клетки-мишени. Например, первичная стимуляция и костимуляция являются примерами иммунной эффекторной функции или ответа Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления иммунную эффекторную функцию или ответ стимулирует действие раскрытого CAR, Адаптера и/или композиций CAR и Адаптера. Такая функция или ответ приводят, например, к CAR-клетке, которая является более эффективной при пролиферации, продукции цитокинов, цитотоксичности или повышению экспрессии маркеров клеточной поверхности, таких как CD25, CD69 и CD107a.

[0546] В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка является Т-клеткой. В других вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка является НК-клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка не является Т-клеткой или НК-клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка является аутологичной иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка является аллогенной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, убивает клетку-мишень. В некоторых вариантах осуществления связывание Адаптера с AD блокирует активность антигена, включающего AD

[0547] В некоторых вариантах осуществления CAR-клетка убивает клетку-мишень после прямого связывания с клеткой-мишенью. В некоторых вариантах осуществления CAR-клетка убивает клетку-мишень после связывания с Адаптером, где Адаптер связан с клеткой-мишенью.

[0548] В некоторых вариантах осуществления связывание CAR с клеткой-мишенью и/или с Адаптером приводит к внутриклеточной сигнализации в клетке, экспрессирующей CAR.

[0549] В некоторых вариантах осуществления связывание CAR с клеткой-мишенью и/или с Адаптером приводит к дегрануляции. Дегрануляция может привести к высвобождению, в зависимости от типа клетки, противомикробных, цитотоксических или других молекул из секреторных гранул в иммунной клетке. Такие молекулы как перфорин (порообразующий цитотоксин) или гранзимы (сериновые протеазы, вызывающие апоптоз в клетке-мишени), помогают Т-клеткам и НК-клеткам уничтожать опухолевые клетки (или другие типы клеток).

[0550] В некоторых вариантах осуществления связывание CAR с клеткой-мишенью и/или с Адаптером приводит к секреции цитокинов клеткой, экспрессирующей CAR.

Цитокином может быть, например, интерферон (IFN γ).

[0551] В некоторых вариантах осуществления связывание CAR с клеткой-мишенью и/или с Адаптером приводит к пролиферации клетки, экспрессирующей CAR.

С. Способы, включающие введение CAR-клетки пациенту

[0552] В настоящем изобретении описаны способы доставки иммунного ответа к клетке-мишени у пациента и/или уничтожению клетки-мишени у пациента, включающие введение Адаптера и/или CAR-клетки, описанных в настоящем изобретении, пациенту. Также в настоящем изобретении описаны способы истощения лимфоцитов (например, В-лимфоцитов), включающие введение Адаптера и/или CAR-клетки, описанных в настоящем изобретении, нуждающемуся в этом пациенту. В конкретных вариантах осуществления изобретение относится к способам лечения рака (например, гемобластоза) или аутоиммунного заболевания или нарушения, включающие введение Адаптера и/или CAR-клетки, описанных в настоящем изобретении, нуждающемуся в этом пациенту.

[0553] В некоторых вариантах осуществления способ доставки иммунного ответа к клетке-мишени у пациента включает введение пациенту клетки, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления способ уничтожения клетки-мишени у нуждающегося в этом пациента включает введение пациенту клетки, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень экспрессирует CD123. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является раковой клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой острого миелоидного лейкоза (ОМЛ). В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой миелодисплазии. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой В-клеточного острого лимфобластного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой волосатоклеточного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой лимфомы Ходжкина. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой бластной плазмцитойдной дендритно-клеточной неоплазии (БПДКН). В некоторых вариантах осуществления способ истощения лимфоцитов у нуждающегося в этом пациента включает введение пациенту клетки, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления лимфоциты экспрессируют CD123. В некоторых вариантах осуществления лимфоциты являются В-лимфоцитами. В некоторых вариантах осуществления способ лечения рака включает введение нуждающемуся в этом пациенту клетки, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гемобластоз. В некоторых вариантах

осуществления гемобластоз гемобластоз представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), миелодиспластический синдром (например, миелодиспластический синдром высокого риска), В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, лимфому Ходжкина или бластную плазмцитойдную дендритно-клеточную неоплазию (БПДКН). В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой ОМЛ. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой миелодиспластический синдром (например, миелодиспластический синдром высокого риска). В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой В-клеточный острый лимфобластный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой волосатоклеточный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой лимфому Ходжкина. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой бластную плазмцитойдную дендритно-клеточную неоплазию (БПДКН). В некоторых вариантах осуществления способ лечения аутоиммунного заболевания или нарушения включает введение нуждающемуся в этом пациенту клетки, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления, аутоиммунным заболеванием или нарушением является красная волчанка. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100.

[0554] В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33.

[0555] В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен включает трансмембранный домен CD8a, 41BB или CD28. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен включает трансмембранный домен CD8a. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CD8a включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CD8a включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен выбран из

группы, состоящей из домена альфа, бета или дзета-цепи Т-клеточного рецептора человека; домена 41BB человека; домена CD28 человека; и их любой комбинации. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен включает внутриклеточный домен костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, 41BB, OX40, CD30, CD40, PD1, лимфоцитарного функционально-ассоциированного антигена 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, NKG2D, B7-H3, лиганда, который специфично связывается с CD83, и их любой комбинации. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 115, 116 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 117.

[0556] В некоторых вариантах осуществления CAR, включающий D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62-66 или 67. В некоторых вариантах осуществления CAR, включающий D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах осуществления CAR, включающий D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления CAR, включающий D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления CAR, включающий D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления CAR, включающий D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66. В некоторых вариантах осуществления CAR, включающий D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67.

[0557] В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является иммунной эффекторной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является Т-клеткой (CAR-Т-клеткой) или естественной киллерной (NK) клеткой (CAR-NK-клеткой). В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка является аутологичной иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка является аллогенной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, не является Т-клеткой или NK-клеткой.

[0558] В некоторых вариантах осуществления способ, раскрытый в настоящем изобретении, включает введение пациенту от приблизительно 10×10^6 до приблизительно 300×10^6 клеток, экспрессирующих CAR, включающий D-домен, который связывается с CD123. В некоторых вариантах осуществления способ, раскрытый в настоящем изобретении, включает введение пациенту от приблизительно 50×10^6 до приблизительно 900×10^6 клеток, экспрессирующих CAR, включающий D-домен, который связывается с CD123. В некоторых вариантах осуществления способ, раскрытый в настоящем

500×10^6 клеток, приблизительно 600×10^6 клеток или приблизительно 700×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления способ, раскрытый в настоящем изобретении, включает введение пациенту двух доз клеток, экспрессирующих CAR, включающий D-домен, который связывается с CD123. В некоторых вариантах осуществления способ, раскрытый в настоящем изобретении, включает введение пациенту трех доз клеток, экспрессирующих CAR, включающий D-домен, который связывается с CD123. В некоторых вариантах осуществления способ, раскрытый в настоящем изобретении, включает введение пациенту четырех доз клеток, экспрессирующих CAR, включающий D-домен, который связывается с CD123. В некоторых вариантах осуществления способ, раскрытый в настоящем изобретении, включает введение пациенту пяти доз клеток, экспрессирующих CAR, включающий D-домен, который связывается с CD123. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является иммунной эффекторной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является Т-клеткой (CAR-Т-клеткой) или естественной киллерной (NK) клеткой (CAR-NK-клеткой). В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, не является Т-клеткой или NK-клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная CAR-клетка является аутологичной иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная CAR-клетка является аллогенной иммунной клеткой. Клетки, экспрессирующие CAR, раскрытые в настоящем изобретении, могут вводить отдельно или в виде фармацевтической композиции в комбинации с разбавителями и/или с другими компонентами, такими как химиотерапевтические средства, антитела, цитокины или популяции клеток. Композиции, раскрытые в настоящем изобретении, предпочтительно изготовлены для внутривенного введения, которое могут производить один или более раз. В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие CAR, вводят внутривенно.

[0559] В некоторых вариантах осуществления введение клеток, экспрессирующих CAR, включает введение фармацевтической композиции, включающей клетку, экспрессирующую CAR.

D. Способы, включающие введение Адаптера и/или CAR-клетки пациенту

[0560] В некоторых вариантах осуществления способ доставки иммунного ответа к клетке-мишени у пациента включает введение пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD р26 АФП. В некоторых вариантах осуществления способ уничтожения клетки-мишени у нуждающегося в этом пациента включает введение пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD р26 АФП. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень экспрессирует CD123. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является раковой клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой

острого миелоидного лейкоза (ОМЛ). В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой миелодисплазии. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой В-клеточного острого лимфобластного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой волосатоклеточного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой лимфомы Ходжкина. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой бластной плазмцитойдендритно-клеточной неоплазии (БПДКН). В некоторых вариантах осуществления способ истощения лимфоцитов у нуждающегося в этом пациента включает введение пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления лимфоциты экспрессируют CD123. В некоторых вариантах осуществления лимфоциты являются В-лимфоцитами. В некоторых вариантах осуществления способ лечения рака включает введение нуждающемуся в этом пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гемобластоз. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), миелодиспластический синдром (например, миелодиспластический синдром высокого риска), В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, лимфому Ходжкина или бластную плазмцитойдендритно-клеточную неоплазию (БПДКН). В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой ОМЛ. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой миелодиспластический синдром (например, миелодиспластический синдром высокого риска). В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой В-клеточный острый лимфобластный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой волосатоклеточный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой лимфому Ходжкина. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой бластную плазмцитойдендритно-клеточную неоплазию (БПДКН). В некоторых вариантах осуществления способ лечения аутоиммунного заболевания или нарушения включает введение нуждающемуся в этом пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунным заболеванием или нарушением является красная волчанка. В некоторых вариантах осуществления пациенту была введена клетка, экспрессирующая CAR, где CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления пациент включает клетку, экспрессирующую CAR, где CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение клетки, экспрессирующей CAR, где CAR включает: (i) домен,

связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен.

[0561] В некоторых вариантах осуществления способ доставки иммунного ответа к клетке-мишени у пациента включает введение пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления способ уничтожения клетки-мишени у нуждающегося в этом пациента включает введение пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень экспрессирует CD123. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является раковой клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой ОМЛ. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой миелодисплазии. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой В-клеточного острого лимфобластного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой волосатоклеточного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой лимфомы Ходжкина. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой бластной плазмцитойдной дендритно-клеточной неоплазии (БПДКН). В некоторых вариантах осуществления способ истощения лимфоцитов у нуждающегося в этом пациента включает введение пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления лимфоциты экспрессируют CD123. В некоторых вариантах осуществления лимфоциты являются В-лимфоцитами. В некоторых вариантах осуществления способ лечения рака включает введение нуждающемуся в этом пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гемобластоз. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), миелодиспластический синдром (например, миелодиспластический синдром высокого риска), В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, лимфому Ходжкина или бластную плазмцитойдную дендритно-клеточную неоплазию (БПДКН). В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой ОМЛ. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой миелодиспластический синдром (например, миелодиспластический синдром высокого риска). В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой В-клеточный острый лимфобластный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой волосатоклеточный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой лимфому Ходжкина. В

некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой бластную плазмацитоидную дендритно-клеточную неоплазию (БПДКН). В некоторых вариантах осуществления способ лечения аутоиммунного заболевания или нарушения включает введение нуждающемуся в этом пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунным заболеванием или нарушением является красная волчанка. В некоторых вариантах осуществления пациенту была введена клетка, экспрессирующая CAR, где: (a) CAR включает: (i) антигенную детерминанту (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления пациент включает клетку, экспрессирующую CAR, где: (a) CAR включает: (i) антигенную детерминанту (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение клетки, экспрессирующей CAR, где: (a) CAR включает: (i) антигенную детерминанту (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен.

[0562] В некоторых вариантах осуществления способ доставки иммунного ответа к клетке-мишени у пациента включает введение пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD, связываемую CAR-рецептором, где пациенту была введена клетка, экспрессирующая CAR, где: (a) CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD), отличной от CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления способ уничтожения клетки-мишени у нуждающегося в этом пациента включает введение пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD, связываемую CAR-рецептором, где пациенту была введена клетка, экспрессирующая CAR, где: (a) CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD), отличной от CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен, где пациенту была введена клетка, экспрессирующая CAR, где: (a) CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD), отличной от CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень экспрессирует CD123. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой ОМЛ. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой миелодисплазии. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой В-клеточного острого лимфобластного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой волосатоклеточного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой лимфомы Ходжкина. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой бластной плазмацитоидной дендритно-клеточной неоплазии (БПДКН). В некоторых вариантах осуществления способ истощения лимфоцитов у

нуждающегося в этом пациента включает введение пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD, связываемую CAR-рецептором, где пациенту была введена клетка, экспрессирующая CAR, где: (a) CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD), отличной от CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления лимфоциты экспрессируют CD123. В некоторых вариантах осуществления лимфоциты являются В-лимфоцитами. В некоторых вариантах осуществления способ лечения рака включает введение нуждающемуся в этом пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD, связываемую CAR-рецептором, где пациенту была введена клетка, экспрессирующая CAR, где: (a) CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD), отличной от CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гемобластоз. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), миелодиспластический синдром (например, миелодиспластический синдром высокого риска), В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, лимфому Ходжкина или бластную плазмцитоидную дендритно-клеточную неоплазию (БПДКН). В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой ОМЛ. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой миелодиспластический синдром (например, миелодиспластический синдром высокого риска). В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой В-клеточный острый лимфобластный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой волосатоклеточный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой лимфому Ходжкина. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой бластную плазмцитоидную дендритно-клеточную неоплазию (БПДКН). В некоторых вариантах осуществления способ лечения аутоиммунного заболевания или нарушения включает введение нуждающемуся в этом пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD, связываемую CAR-рецептором, где пациенту была введена клетка, экспрессирующая CAR, где: (a) CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD), отличной от CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунным заболеванием или нарушением является красная волчанка.

[0563] В некоторых вариантах осуществления способ доставки иммунного ответа к клетке-мишени у пациента включает введение пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD, связываемую CAR-рецептором, где пациент включает клетку, экспрессирующую CAR, где: (a) CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD), отличной от CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В

некоторых вариантах осуществления способ уничтожения клетки-мишени у нуждающегося в этом пациента включает введение пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD, связываемую CAR-рецептором, где пациент включает клетку, экспрессирующую CAR, где: (a) CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD), отличной от CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень экспрессирует CD123. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является раковой клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой ОМЛ. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой миелодисплазии. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой В-клеточного острого лимфобластного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой волосатоклеточного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой лимфомы Ходжкина. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой бластной плазмцитойдендритно-клеточной неоплазии (БПДКН). В некоторых вариантах осуществления способ истощения лимфоцитов у нуждающегося в этом пациента включает введение пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD, связываемую CAR-рецептором, где пациент включает клетку, экспрессирующую CAR, где: (a) CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD), отличной от CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления лимфоциты экспрессируют CD123. В некоторых вариантах осуществления лимфоциты являются В-лимфоцитами. В некоторых вариантах осуществления способ лечения рака включает введение нуждающемуся в этом пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD, связываемую CAR-рецептором, где пациент включает клетку, экспрессирующую CAR, где: (a) CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD), отличной от CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гемобластоз. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), миелодиспластический синдром (например, миелодиспластический синдром высокого риска), В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, лимфому Ходжкина или бластную плазмцитойдендритно-клеточную неоплазию (БПДКН). В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой ОМЛ. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой миелодиспластический синдром (например, миелодиспластический синдром высокого риска). В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой В-клеточный острый лимфобластный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой волосатоклеточный лейкоз. В некоторых вариантах

осуществления гемобластоз представляет собой лимфому Ходжкина. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой бластную плазмцитоплазмическую дендритно-клеточную неоплазию (БПДКН). В некоторых вариантах осуществления способ лечения аутоиммунного заболевания или нарушения включает введение нуждающемуся в этом пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD, связываемую CAR-рецептором, где пациент включает клетку, экспрессирующую CAR, где: (a) CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD), отличной от CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунным заболеванием или нарушением является красная волчанка.

[0564] В некоторых вариантах осуществления способ доставки иммунного ответа к клетке-мишени у пациента включает введение пациенту Адаптера, включающего: (i) первый домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с AD-мишенью, и (ii) второй домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления способ уничтожения клетки-мишени у нуждающегося в этом пациента включает введение пациенту Адаптера, включающего: (i) первый домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с AD-мишенью, и (ii) второй домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень экспрессирует AD-мишень. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является раковой клеткой. В некоторых вариантах осуществления способ истощения лимфоцитов у нуждающегося в этом пациента включает введение пациенту Адаптера, включающего: (i) первый домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с AD-мишенью, и (ii) второй домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления лимфоциты экспрессируют AD-мишень. В некоторых вариантах осуществления лимфоциты являются В-лимфоцитами или Т-лимфоцитами. В некоторых вариантах осуществления способ лечения рака включает введение нуждающемуся в этом пациенту Адаптера, включающего: (i) первый домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с AD-мишенью, и (ii) второй домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гемобластоз. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), миелодиспластический синдром (например, миелодиспластический синдром высокого риска), В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, лимфому Ходжкина или бластную плазмцитоплазмическую дендритно-клеточную неоплазию (БПДКН). В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой ОМЛ. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой миелодиспластический синдром

(например, миелодиспластический синдром высокого риска). В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой В-клеточный острый лимфобластный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой волосатоклеточный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой лимфому Ходжкина. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой бластную плазмцитоидную дендритно-клеточную неоплазию (БПДКН). В некоторых вариантах осуществления способ лечения аутоиммунного заболевания или нарушения включает введение нуждающемуся в этом пациенту Адаптера, включающего: (i) первый домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с AD-мишенью, и (ii) второй домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунным заболеванием или нарушением является ревматоидный артрит. В некоторых вариантах осуществления пациенту была введена клетка, экспрессирующая CAR, где CAR включает: (i) антигенную детерминанту (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления пациент включает клетку, экспрессирующую CAR, где CAR включает: (i) антигенную детерминанту (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение клетки, экспрессирующей CAR, где CAR включает: (i) антигенную детерминанту (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен.

[0565] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящем изобретении, включает введение нуждающемуся в этом субъекту приблизительно 100×10^6 клеток, экспрессирующих CAR, который специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, и больше чем одной дозы приблизительно 0,1 мг/кг Адаптера, включающего D-домен, который связывается с CD123, и антигенную детерминанту p26. В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящем изобретении, включает введение нуждающемуся в этом субъекту приблизительно 100×10^6 клеток, экспрессирующих CAR, который специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, и больше чем одной дозы приблизительно 0,3 мг/кг Адаптера, включающего D-домен, который связывается с CD123, и антигенную детерминанту p26. В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящем изобретении, включает введение нуждающемуся в этом субъекту приблизительно 300×10^6 клеток, экспрессирующих CAR, который специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, и больше чем одной дозы приблизительно 0,1 мг/кг Адаптера, включающего D-домен, который связывается с CD123, и антигенную детерминанту p26. В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящем изобретении, включает введение нуждающемуся в этом субъекту приблизительно 300×10^6 клеток, экспрессирующих CAR, который специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, и больше чем одной дозы приблизительно 0,3 мг/кг Адаптера, включающего D-домен, который

связывается с CD123, и антигенную детерминанту p26. В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящем изобретении, включает введение нуждающемуся в этом субъекту приблизительно 300×10^6 клеток, экспрессирующих CAR, который специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, и больше чем одной дозы приблизительно 0,9 мг/кг Адаптера, включающего D-домен, который связывается с CD123, и антигенную детерминанту p26. В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящем изобретении, включает введение нуждающемуся в этом субъекту приблизительно 900×10^6 клеток, экспрессирующих CAR, который специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, и больше чем одной дозы приблизительно 0,1 мг/кг Адаптера, включающего D-домен, который связывается с CD123, и антигенную детерминанту p26. В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящем изобретении, включает введение нуждающемуся в этом субъекту приблизительно 900×10^6 клеток, экспрессирующих CAR, который специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, и больше чем одной дозы приблизительно 0,3 мг/кг Адаптера, включающего D-домен, который связывается с CD123, и антигенную детерминанту p26. В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящем изобретении, включает введение нуждающемуся в этом субъекту приблизительно 900×10^6 клеток, экспрессирующих CAR, который специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, и больше чем одной дозы приблизительно 0,9 мг/кг Адаптера, включающего D-домен, который связывается с CD123, и антигенную детерминанту p26. В некоторых вариантах осуществления первую дозу Адаптера вводят в тот же день, что и клетки, экспрессирующие CAR. В некоторых вариантах осуществления первую дозу Адаптера вводят через 1, 2, 3, 4 или спустя 5 дней после введения клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ежедневной дозы Адаптера в течение 1 недели. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ежедневной дозы Адаптера в течение 2 недель. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ежедневной дозы Адаптера в течение 3 недель. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ежедневной дозы Адаптера в течение 4 недель. В некоторых вариантах осуществления вводимая ежедневная доза Адаптера является одной и той же. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение 3 доз Адаптера каждую неделю после завершения введения ежедневных доз. В некоторых вариантах осуществления три еженедельных дозы Адаптера вводят в понедельник, среду и пятницу. В некоторых вариантах осуществления доза Адаптера, вводимая в один день, является одной и той же. В некоторых вариантах осуществления введение 3 доз Адаптера каждую неделю продолжают в течение приблизительно 1, 2, 3, 4, 5 или 6 месяцев. В некоторых вариантах осуществления введение 3 доз Адаптера каждую неделю продолжают, пока клетки, экспрессирующие CAR, больше не удастся измерить в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет гемобластоз. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет гемобластоз, где раковые клетки

экспрессируют CD123. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет острый миелоидный лейкоз (ОМЛ). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет миелодиспластический синдром (МДС). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет миелодиспластический синдром высокого риска (МДС). В некоторых вариантах осуществления CAR, который специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, включает D-домен, который специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, где D-домен необязательно включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70-73 или 92-94. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70 или 73. В некоторых вариантах осуществления CAR, который специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 или 69. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления антигенная детерминанта p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37-43 или 44. В некоторых вариантах осуществления антигенная детерминанта p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления антигенная детерминанта p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является иммунной эффекторной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является Т-клеткой (CAR-Т-клеткой) или естественной киллерной (NK) клеткой (CAR-NK-клеткой). В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, не является Т-клеткой или NK-клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная CAR-клетка является аутологичной иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная CAR-клетка является аллогенной иммунной клеткой.

[0566] В некоторых вариантах осуществления способа, описанного в настоящем изобретении, Адаптер вводят в дозе от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 25 мг/кг, от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг, от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят в дозе от приблизительно 1 мкг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 5 мкг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 10 мкг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от

некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят подкожно. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

[0567] В некоторых вариантах осуществления способа, описанного в настоящем изобретении, Адаптер вводят в дозе от приблизительно 0,2 мг до приблизительно 200 мг, от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 100 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 50 мг, от приблизительно 2 мг до приблизительно 25 мг или от приблизительно 2 мг до приблизительно 12 мг. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят в дозе приблизительно 0,4 мг, приблизительно 0,8 мг, приблизительно 1,6 мг, приблизительно 2,8 мг, приблизительно 3 мг, приблизительно 4 мг, приблизительно 8 мг, приблизительно 12 мг, приблизительно 16 мг, приблизительно 20 мг, приблизительно 24 мг, приблизительно 28 мг, приблизительно 40 мг или приблизительно 80 мг. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят в дозе приблизительно 1,6 мг, приблизительно 2,8 мг, приблизительно 3 мг, приблизительно 4 мг, приблизительно 8 мг, приблизительно 12 мг, приблизительно 16 мг или приблизительно 20 мг. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят подкожно. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

[0568] В некоторых вариантах осуществления способа, описанного в настоящем изобретении, вводят больше чем одну дозу Адаптера. В некоторых вариантах осуществления больше чем одна доза Адаптера является постоянной дозой. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят в различных дозах. В некоторых вариантах осуществления вводимое количество Адаптера увеличивается с течением временем. В некоторых вариантах осуществления вводимое количество Адаптера уменьшается с течением временем. В некоторых вариантах осуществления Адаптер сначала вводят в низкой дозе от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 0,5 мг/кг, с последующим введением в более высокой дозе от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят внутривенно. В некоторых вариантах

осуществления Адаптер вводят подкожно. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

[0569] В некоторых вариантах осуществления способа, описанного в настоящем изобретении, Адаптер вводят ежедневно. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят два раза в день. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят три раза в день. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят четыре раза в день. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят каждые 12 часов. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят каждые 8 часов. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят каждые 6 часов. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят каждые 4 часа. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят в виде непрерывной инфузии. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят через день. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят каждые три дня. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят два раза в неделю. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят два раза в неделю, например, в понедельник, среду и пятницу. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят еженедельно. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят подкожно. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

[0570] В некоторых вариантах осуществления способа, описанного в настоящем изобретении, Адаптер вводят в течение семи дней. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят в течение 2 недель. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят в течение 3 недель. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят в течение 4 недель. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят в течение 1 месяца. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят в течение 2 месяцев. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят в течение 3 месяцев. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят подкожно. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность,

выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

[0571] В некоторых вариантах осуществления способа, описанного в настоящем изобретении, Адаптер вводят с одной и той же частотой в течение периода лечения. В некоторых вариантах осуществления частота введения уменьшается в течение периода лечения. В некоторых вариантах осуществления Адаптер сначала вводят ежедневно в течение приблизительно одной недели, с последующим введением два раза в неделю. В некоторых вариантах осуществления Адаптер сначала вводят от одного до трех раз в день в течение приблизительно одной недели, с последующим ежедневным введением. В некоторых вариантах осуществления Адаптер сначала вводят от одного до трех раз в день в течение приблизительно одной недели, с последующим введением два раза в неделю или один раз в неделю. В некоторых вариантах осуществления Адаптер сначала вводят в виде непрерывной инфузии в течение приблизительно одной недели, с последующим ежедневным введением. В некоторых вариантах осуществления Адаптер сначала применен в виде непрерывной инфузии в течение приблизительно одной недели, с последующим введением два раза в неделю или один раз в неделю. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят подкожно. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает D-домен, который связывается с CD123 и включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

[0572] В некоторых вариантах осуществления способа, описанного в настоящем изобретении, клетки, экспрессирующие CAR, который специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, были введены субъекту, получающему Адаптер. В некоторых вариантах осуществления от приблизительно 10×10^6 до приблизительно 300×10^6 клеток, экспрессирующих CAR, который специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, были введены субъекту, получающему Адаптер. В некоторых вариантах осуществления от приблизительно 50×10^6 до приблизительно 900×10^6 клеток, экспрессирующих CAR, который специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, были введены субъекту, получающему Адаптер. В некоторых вариантах осуществления от приблизительно 10×10^6 до приблизительно 500×10^6 клеток, экспрессирующих CAR, который специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, были введены субъекту, получающему Адаптер. В некоторых вариантах

детерминантой р26 АФП, были введены субъекту, получающему Адаптер. В некоторых вариантах осуществления приблизительно 600×10^6 клеток, экспрессирующих CAR, который специфично связывается с антигенной детерминантой р26 АФП, были введены субъекту, получающему Адаптер. В некоторых вариантах осуществления приблизительно 700×10^6 клеток, экспрессирующих CAR, который специфично связывается с антигенной детерминантой р26 АФП, были введены субъекту, получающему Адаптер. В некоторых вариантах осуществления CAR, который специфично связывается с антигенной детерминантой р26 АФП, был введен субъекту в то же время, что и первая доза Адаптера. В некоторых вариантах осуществления CAR, который специфично связывается с антигенной детерминантой р26 АФП, был введен субъекту перед первой дозой Адаптера. В некоторых вариантах осуществления антигенная детерминанта р26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37-43 или 44. В некоторых вариантах осуществления антигенная детерминанта р26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления антигенная детерминанта р26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления CAR, который специфично связывается с антигенной детерминантой р26 АФП, включает D-домен, который специфично связывается с антигенной детерминантой р26 АФП, где D-домен необязательно включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70-73 или 92-94. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который специфично связывается с антигенной детерминантой р26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70 или 73. В некоторых вариантах осуществления CAR, который специфично связывается с антигенной детерминантой р26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 или 69. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является иммунной эффекторной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является Т-клеткой (CAR-Т-клеткой) или естественной киллерной (NK) клеткой (CAR-NK-клеткой). В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, не является Т-клеткой или NK-клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная CAR-клетка является аутологичной иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная CAR-клетка является аллогенной иммунной клеткой. Клетки, экспрессирующие CAR, раскрытые в настоящем изобретении, можно вводить отдельно или в виде фармацевтической композиции в комбинации с разбавителями и/или с другими компонентами, такими как химиотерапевтические средства, антитела, цитокины или популяции клеток. Композиции, раскрытые в настоящем изобретении, предпочтительно изготовлены для внутривенного введения, которое могут производить один или более раз. В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие CAR, вводят внутривенно.

[0573] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящем изобретении, включает введение клетки, экспрессирующей CAR, где CAR включает: (i)

приблизительно 150×10^6 клеток, приблизительно 200×10^6 клеток, приблизительно 250×10^6 клеток, приблизительно 300×10^6 клеток, приблизительно 400×10^6 клеток, приблизительно 500×10^6 клеток, приблизительно 600×10^6 клетки или приблизительно 700×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления две дозы клеток, экспрессирующих CAR, который специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, вводят субъекту. В некоторых вариантах осуществления три дозы клеток, экспрессирующих CAR, который специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, вводят субъекту. В некоторых вариантах осуществления четыре дозы клеток, экспрессирующих CAR, который специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, вводят субъекту. В некоторых вариантах осуществления пять доз клеток, экспрессирующих CAR, который специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, вводят субъекту. В некоторых вариантах осуществления CAR, который специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, вводят субъекту в одно и то же время, что и первую дозу Адаптера. В некоторых вариантах осуществления CAR, который специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, вводят субъекту перед первой дозой Адаптера. В некоторых вариантах осуществления антигенная детерминанта p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37-43 или 44. В некоторых вариантах осуществления антигенная детерминанта p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления антигенная детерминанта p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления CAR, который специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, включает D-домен, который специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, где D-домен необязательно включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70-73 или 92-94. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70 или 73. В некоторых вариантах осуществления CAR, который специфично связывается с антигенной детерминантой p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 или 69. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является иммунной эффекторной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является Т-клеткой (CAR-Т-клеткой) или естественной киллерной (NK) клеткой (CAR-NK-клеткой). В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, не является Т-клеткой или NK-клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная CAR-клетка является аутологичной иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная CAR-клетка является аллогенной иммунной клеткой. Клетки, экспрессирующие CAR, раскрытые в настоящем изобретении, можно вводить отдельно или в виде фармацевтической композиции в комбинации с разбавителями и/или с другими компонентами, такими как химиотерапевтические средства, антитела, цитокины или популяции клеток. Композиции, раскрытые в настоящем

изобретении, предпочтительно изготовлены для внутривенного введения, которое могут производить один или более раз. В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие CAR, вводят внутривенно.

[0574] В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят в дозе от приблизительно 10 мкг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 50 мкг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 10 мкг/кг до приблизительно 2 мг/кг, от приблизительно 20 мкг/кг до приблизительно 1 мг/кг или от приблизительно 50 мкг/кг до приблизительно 0,5 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят в дозе приблизительно 0,01 мг/кг, приблизительно 0,02 мг/кг, приблизительно 0,04 мг/кг, приблизительно 0,07 мг/кг, приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 0,2 мг/кг, приблизительно 0,3 мг/кг, приблизительно 0,4 мг/кг, приблизительно 0,5 мг/кг, приблизительно 0,6 мг/кг, приблизительно 0,7 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг или приблизительно 2 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят в дозе приблизительно 0,07 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят в дозе приблизительно 0,1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят в дозе приблизительно 0,1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят в дозе приблизительно 1,6 мг, приблизительно 2,8 мг, приблизительно 3 мг, приблизительно 4 мг, приблизительно 8 мг, приблизительно 12 мг, приблизительно 16 мг или приблизительно 20 мг. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят в дозе приблизительно 0,1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят в дозе от приблизительно 0,2 мг до приблизительно 200 мг, от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 100 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 50 мг, от приблизительно 2 мг до приблизительно 25 мг или от приблизительно 2 мг до приблизительно 12 мг. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят подкожно. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят ежедневно. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят два раза в день, три раза в день или четыре раза в день. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят через день. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят каждые три дня. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят два раза в неделю. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят еженедельно. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят в течение семи дней. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят в течение от приблизительно недели до приблизительно 2 месяцев. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят с одной и той же частотой в течение периода лечения. В некоторых вариантах осуществления частота введения уменьшается в течение периода лечения. В некоторых вариантах осуществления Адаптер сначала вводят ежедневно в течение приблизительно одной недели, с последующим введением два раза в неделю. В одном варианте осуществления пациенту были введены от приблизительно 50×10^6 до приблизительно 300×10^6 клеток, экспрессирующих CAR. В одном варианте осуществления пациенту были введены приблизительно 100×10^6 клеток, экспрессирующих CAR.

[0575] В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с

CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. в некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33.

[0576] В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен включает трансмембранный домен CD8a, 41BB или CD28. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен включает трансмембранный домен CD8a. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CD8a включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CD8a включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен выбран из группы, состоящей из домена альфа, бета или дзета-цепи T-клеточного рецептора человека; домена 41BB человека; домена CD28 человека; и их любой комбинации. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен включает внутриклеточный домен костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, 41BB, OX40, CD30, CD40, PD1, лимфоцитарного функционально-ассоциированного антигена 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, NKG2D, B7-H3, лиганда, который специфично связывается с CD83, и их любой комбинации. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 115, 116 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 117.

[0577] В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-43 и 44. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

[0578] В некоторых вариантах осуществления ADBD, который связывается с AD p26 АФП, включает scFv, который связывается с AD p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления ADBD, который связывается с AD p26 АФП, включает D-домен, который связывается с AD p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который

связывается с р26 АФП, включает аминокислотную последовательность AD, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с р26 АФП, включает аминокислотную последовательность AD SEQ ID NO: 70-73 или 92-94. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с AD р26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73.

[0579] В некоторых вариантах осуществления CAR, включающий D-домен, который связывается с AD р26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления CAR, включающий D-домен, который связывается с AD р26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69.

[0580] В некоторых вариантах осуществления CAR включает ADBD, который связывается с AD, отличной от CD123, ADBD связывается с опухолевым антигеном. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген выбран из группы: BCMA, CD19, CD22, CS1, HER2, TACI, BAFFR и PDL1. В некоторых вариантах осуществления опухолевым антигеном является BCMA. В некоторых вариантах осуществления опухолевым антигеном является CD19. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген выбран из группы: CD45, CD26, CD30, CD33 и CD38.

[0581] В некоторых вариантах осуществления Адаптер, включающий (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD р26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50-54 или 55. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD р26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD р26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD р26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD р26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD р26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD р26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD р26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56-60 или 61. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD р26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56. В некоторых вариантах осуществления Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, и (ii) AD р26 АФП, включает аминокислотную

который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

[0584] В некоторых вариантах осуществления AD-мишень выбрана из: CD45, CD26, CD30, CD33 и CD38. В некоторых вариантах осуществления AD-мишень выбрана из: CD19, CD22, CD123, BCMA, CS1, HER2, TACI, BAFFR и PDL1. В некоторых вариантах осуществления AD-мишень представляет собой BCMA. В некоторых вариантах осуществления AD-мишень представляет собой CD19. В некоторых вариантах осуществления AD-мишень представляет собой CD45. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является иммунной клеткой.

[0585] В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является иммунной эффекторной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является естественным киллером (NK-клеткой).

[0586] В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является раковой клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой ОМЛ. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой миелодисплазии. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой В-клеточного острого лимфобластного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой волосатоклеточного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой лимфомы Ходжкина. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой бластной плазмцитоидной дендритно-клеточной неоплазии (БПДКН).

[0587] В некоторых вариантах осуществления клетку, экспрессирующую CAR, и Адаптер вводят отдельно в любом порядке. В некоторых вариантах осуществления введение Адаптера включает введение фармацевтической композиции, включающей Адаптер. В некоторых вариантах осуществления введение Адаптера и клетки, экспрессирующей CAR, включает введение фармацевтической композиции, включающей Адаптер, и фармацевтической композиции, включающей клетку, экспрессирующую CAR.

[0588] В некоторых вариантах осуществления пациент ранее проходил лечение Адаптером (в дополнение к клетке, экспрессирующей CAR). В некоторых вариантах осуществления Адаптер, вводимый пациенту, и Адаптер, который ранее вводился пациенту, связываются с разными AD (например, на одной и той же или на разных клетках-мишенях).

[0589] В некоторых вариантах осуществления AD-мишень выбрана из: CD45, CD26, CD30, CD33 и CD38. В некоторых вариантах осуществления AD-мишень выбрана из: CD19, CD22, CD123, BCMA, CS1, HER2, TACI, BAFFR и PDL1. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой BCMA. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой CD45. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой CS1. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой CD123. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой CD19. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой CD22. В других

вариантах осуществления AD-мишень представляет собой TACI. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой BAFFR. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой PDL1. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой HER2.

[0590] В некоторых вариантах осуществления, где CAR включает ADBD, который связывается с AD, отличной от CD123, ADBD связывается с опухолевым антигеном. В других вариантах осуществления опухолевый антиген выбран из группы: CD45, CD26, CD30, CD33 и CD38. В других вариантах осуществления опухолевый антиген выбран из группы: BCMA, CD19, CD22, CS1, HER2, TACI, BAFFR и PDL1. В других вариантах осуществления опухолевым антигеном является BCMA. В других вариантах осуществления опухолевым антигеном является CD19.

[0591] В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является иммунной эффекторной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является Т-клеткой (CAR-Т-клеткой) или естественной киллерной (NK) клеткой (CAR-NK-клеткой). В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка является аутологичной иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка является аллогенной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, не является Т-клеткой или NK-клеткой.

[0592] В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой ОМЛ. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой миелодисплазии. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой В-клеточного острого лимфобластного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой волосатоклеточного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой лимфомы Ходжкина. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой бластной плазмоцитоидной дендритно-клеточной неоплазии (БПДКН).

[0593] Контакт может происходить *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. В одном варианте осуществления контакт происходит в организме пациента, например, пациента-человека, например, после введения Адаптера пациенту, получившему клетку, экспрессирующую CAR, или после введения клетки, экспрессирующей CAR, пациенту, получившему Адаптер. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение Адаптера пациенту, которому ранее была введена клетка, экспрессирующая CAR.

[0594] В некоторых вариантах осуществления CAR включает ADBD на основе одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv). В других вариантах осуществления CAR включает ADBD на основе связывающего домена с альтернативным каркасом (ASBD). В других вариантах осуществления CAR включает D-домен.

[0595] В некоторых вариантах осуществления CAR включает 2 ADBD. В других вариантах осуществления CAR включает ASBD и scFv. В других вариантах осуществления

CAR включает D-домен и scFv. В некоторых вариантах осуществления CAR включает 2 ASBD. В других вариантах осуществления CAR включает 2 D-домена.

[0596] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен CAR является сигнальным доменом. В других вариантах осуществления внутриклеточный домен CAR включает основной сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен CAR включает основной сигнальный домен CD3 ζ. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен CAR дополнительно включает костимулирующий сигнальный домен. В других вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен выбран из: CD28, 41BB, CD27 и CD134. В конкретных вариантах осуществления CAR внутриклеточный сигнальный домен включает костимулирующий сигнальный домен 41BB. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 115, 116 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 117.

[0597] В некоторых вариантах осуществления AD-мишень выбрана из: CD45, CD26, CD30, CD33 и CD38. В некоторых вариантах осуществления AD-мишень выбрана из: CD19, CD22, CD123, BCMA, CS1, HER2, TACI, BAFFR и PDL1. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой BCMA. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой CS1. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой CD123. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой CD19. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой CD22. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой TACI. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой BAFFR. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой PDL1. В других вариантах осуществления AD-мишень представляет собой HER2.

[0598] В некоторых вариантах осуществления CAR включает 2 ADBD, которые связываются с отдельными мишенями. В других вариантах осуществления CAR связывается с CD19 и CD123. В других вариантах осуществления CAR связывается с BCMA и CD123. В других вариантах осуществления CAR связывается с CD22 и CD123. В других вариантах осуществления CAR связывается с PDL1 и CD123.

[0599] В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает AD опухолевого антигена. В других вариантах осуществления опухолевый антиген выбран из группы: CD45, CD26, CD30, CD33 и CD38.

[0600] В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает AD опухолевого антигена. В других вариантах осуществления опухолевый антиген выбран из группы: BCMA, CD19, CD22, CS1, HER2, TACI, BAFFR и PDL1.

[0601] В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который представляет собой scFv. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который представляет собой ASBD. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает D-домен.

[0602] В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает два ADBD. В других вариантах осуществления Адаптер включает два ADBD, которые: (a) являются одинаковыми, (b) связываются с одной и той же антигенной детерминантой, (c) связываются с разными AD одного и того же антигена, (d) связываются с разными антигенами на одной и той же клетке или (e) связываются с разными антигенами на разных клетках. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает два ASBD. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает два D-домена. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который представляет собой scFv, и ADBD, который представляет собой ASBD. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который представляет собой scFv, и ADBD, который представляет собой D-домен.

[0603] В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с элементом, выбранным из: CD45, CD26, CD30, CD33 и CD38. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD45. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD26. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD30. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD33. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD38. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD45.

[0604] В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с элементом, выбранным из: BCMA, CD123, CD19, CD22, CS1, HER2, TACI, BAFFR и PDL1. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с BCMA. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD123. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD19. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD22. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CS1. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с HER2. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с TACI. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с BAFFR. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с PDL1.

[0605] В некоторых вариантах осуществления Адаптер является биспецифичным. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD123, и ADBD, который связывается с CD33. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD123, и ADBD, который связывается с CD38. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с CD123, и ADBD, который связывается с LeY. В других вариантах осуществления Адаптер включает ADBD, который связывается с PDL1, и ADBD, который связывается с CD123.

[0606] В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является опухолевой клеткой. В других вариантах осуществления опухолевая клетка выбрана из группы: острого

миелоидного лейкоза (ОМЛ), клетки миелодисплазии, В-клеточного острого лимфобластного лейкоза, волосатоклеточного лейкоза, лимфомы Ходжкина и бластной плазматоидной дендритно-клеточной неоплазии (БПДКН). В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка является опухолевой клеткой ОМЛ. В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка является клеткой миелодисплазии. В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка является опухолевой клеткой В-клеточного острого лимфобластного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка является опухолевой клеткой волосатоклеточного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка является опухолевой клеткой лимфомы Ходжкина. В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка является опухолевой клеткой БПДКН. В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка экспрессирует CD123.

[0607] В способах уничтожения клетки-мишени, раскрытых в настоящем изобретении, клетка-мишень может быть клеткой иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является В-клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является интактной Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является Т-клеткой памяти. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является эндотелиальной клеткой.

[0608] В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, является иммунной эффекторной клеткой. Иммунная эффекторная клетка является клеткой, которая участвует в иммунном ответе, например, в стимуляции иммунного эффекторного ответа. Примеры иммунных эффекторных клеток включают Т-клетки (например, альфа/бета Т-клетки и гамма/дельта Т-клетки), В-клетки, естественные киллеры (НК-клетки), естественные Т-киллеры (НКТ-клетки), тучные клетки и фагоциты миелоидной линии. Иммунная эффекторная функция или иммунный эффекторный ответ являются функцией или ответом, например, иммунной эффекторной клетки, которые улучшают или стимулируют иммунную атаку клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная функция или ответ относятся к свойству Т или НК-клетки, которое вызывает цитолиз или ингибирование роста или пролиферации клетки-мишени. Например, основная стимуляция и костимуляция являются примерами иммунной эффекторной функции или ответа Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления иммунная эффекторная функция или ответ вызваны действием раскрытого CAR, Адаптера и/или композиций CAR и Адаптера. Такая функция или ответ приводят, например, к получению CAR-клетки, которая является более эффективной при пролиферации, продукции цитокинов, цитотоксичности или повышенной экспрессии маркеров клеточной поверхности, таких как CD25, CD69 и CD107a.

[0609] В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка является Т-клеткой. В других вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка является НК-клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная

клетка не является Т-клеткой или НК-клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка является аутологичной иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка является аллогенной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, убивает клетку-мишень. В некоторых вариантах осуществления связывание Адаптера с AD блокирует активность антигена, включающего AD.

[0610] В некоторых вариантах осуществления CAR-клетка убивает клетку-мишень после прямого связывания с клеткой-мишенью. В некоторых вариантах осуществления CAR-клетка убивает клетку-мишень после связывания с Адаптером, где Адаптер связан с клеткой-мишенью.

[0611] В некоторых вариантах осуществления связывание CAR с клеткой-мишенью и/или с Адаптером приводит к внутриклеточной сигнализации в клетке, экспрессирующей CAR.

[0612] В некоторых вариантах осуществления связывание CAR с клеткой-мишенью и/или с Адаптером приводит к дегрануляции. Дегрануляция может привести к высвобождению, в зависимости от типа клетки, противомикробных, цитотоксических или других молекул из секреторных гранул в иммунной клетке. Такие молекулы, как перфорин (порообразующий цитотоксин) или гранзимы (сериновые протеазы, вызывающие апоптоз в клетке-мишени), помогают Т-клеткам и НК-клеткам убивать опухолевые клетки (или другие типы клеток).

[0613] В некоторых вариантах осуществления связывание CAR с клеткой-мишенью и/или с Адаптером приводит к секреции цитокинов клеткой, экспрессирующей CAR. Цитокином может быть, например, интерферон ($IFN\gamma$).

[0614] В некоторых вариантах осуществления связывание CAR с клеткой-мишенью и/или с Адаптером приводит к пролиферации клетки, экспрессирующей CAR.

[0615] В некоторых вариантах осуществления способ, раскрытый в настоящем изобретении, включает введение Адаптера и клетки, экспрессирующей CAR, пациенту. Адаптер и клетку, экспрессирующую CAR, могут вводить в одной фармацевтической композиции или в разных фармацевтических композициях. Адаптер и клетку, экспрессирующую CAR, могут вводить в разных фармацевтических композициях. Адаптер и клетку, экспрессирующую CAR, могут вводить одновременно или последовательно. В некоторых вариантах осуществления клетку, экспрессирующую CAR, и Адаптер вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления клетку, экспрессирующую CAR, и Адаптер вводят последовательно. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят после введения клетки, экспрессирующей CAR. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят субъекту, которому ранее была введена иммунная CAR-клетка. В некоторых вариантах осуществления клетку, экспрессирующую CAR, вводят перед Адаптером.

[0616] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам, включающим введение субъекту терапевтически эффективного количества иммунной

CAR-клетки, включающей химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR включает мишень-связывающий домен, включающий D-домен, который специфично связывает p26 АФП (например, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94), трансмембранный домен и внутриклеточный домен (включающий сигнальный домен). В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения субъекта, имеющего рак, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества иммунной CAR-клетки, включающей химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR включает мишень-связывающий домен, включающий D-домен, который специфично связывает p26 АФП (например, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 70-73 и 92-94), трансмембранный домен и внутриклеточный домен (включающий сигнальный домен). В некоторых вариантах осуществления p26-связывающий DD включают аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73. В некоторых вариантах осуществления вводимая иммунная CAR-клетка является иммунной эффекторной клеткой. В некоторых вариантах осуществления вводимая иммунная CAR-клетка является Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления вводимая иммунная CAR-клетка является НК-клеткой. В некоторых вариантах осуществления вводимая иммунная CAR-клетка не является Т-клеткой или НК-клеткой. В других вариантах осуществления субъекту вводят комбинацию различных типов иммунных CAR-клеток (например, НК-клеток и Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления иммунная CAR-клетка является аутологичной иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная CAR-клетка является аллогенной иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления введение иммунной CAR-клетки, которая специфично связывает p26, субъекту делает субъекта восприимчивым к лечению рака путем введения полипептида Адаптера, включающего: (i) антигенную детерминанту p26 и (ii) мишень-связывающий домен, экспрессируемый раковой клеткой субъекта (например, CD123), где Адаптер направляет или перенаправляет иммунную CAR-клетку на генерацию цитотоксического сигнала, который приводит к цитотоксическим эффектам в отношении раковой клетки, обеспечивая, таким образом, лечение рака. Иммунную CAR-клетку и Адаптер могут вводить одновременно или последовательно в любом порядке. В некоторых вариантах осуществления иммунную CAR-клетку и Адаптер вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления иммунную CAR-клетку и Адаптер вводят последовательно. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят после введения иммунной CAR-клетки. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят субъекту, которому ранее была введена иммунная CAR-клетка.

[0617] В некоторых вариантах осуществления, где CAR-Т-клетки вводят субъекту, имеющему рак, связывание представляющей интерес мишени (например, CD123 или p26 АФП) стимулирует CAR-Т-клетку инициировать внутриклеточную сигнализацию. В других вариантах осуществления связывание CAR-Т-клетки с представляющей интерес мишенью стимулирует Т-клетку инициировать внутриклеточную сигнализацию и секретировать цитокины. В других вариантах осуществления связывание CAR-Т-клетки с

представляющей интерес мишенью стимулирует Т-клетку инициировать внутриклеточную сигнализацию, секретировать цитокины и производить дегрануляцию, что приводит к цитотоксическим эффектам в отношении раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления CAR-T-клетка пролиферирует в ответ на связывание представляющей интерес мишени. Предпочтительно, в некоторых вариантах осуществления, активность CAR-T-клетки не приводит к Т-клетке, демонстрирующей фенотип, связанный с истощением Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CAR-T-клетки включает CD8a, 41BB или CD28, а цитоплазматический домен включает альфа, бета или дзета-цепь Т-клеточного рецептора. В некоторых вариантах осуществления цитоплазматический домен содержит последовательность SEQ ID NO: 115, 116 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления цитоплазматический домен содержит последовательность SEQ ID NO: 117.

[0618] В некоторых вариантах осуществления, где р26-связывающая иммунная CAR-клетка и полипептид Адаптера вводят субъекту, имеющему рак, направление или перенаправление иммунной CAR-клетки полипептидом Адаптера на представляющую интерес мишень (например, CD123) стимулирует иммунную CAR-клетку инициировать внутриклеточную сигнализацию. В других вариантах осуществления направление или перенаправление иммунной CAR-клетки посредством полипептида Адаптера стимулирует иммунную клетку инициировать внутриклеточную сигнализацию и секретировать цитокины. В других вариантах осуществления направление или перенаправление иммунной CAR-клетки на представляющую интерес мишень стимулирует иммунную клетку инициировать внутриклеточную сигнализацию, секретировать цитокины и производить дегрануляцию, что приводит к цитотоксическим эффектам в отношении раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления иммунная CAR-клетка пролиферирует в ответ на связывание представляющей интерес мишени. В некоторых вариантах осуществления вводимая иммунная CAR-клетка является иммунной эффекторной клеткой. В некоторых вариантах осуществления вводимая иммунная CAR-клетка является Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления вводимая иммунная CAR-клетка является NK-клеткой. В некоторых вариантах осуществления вводимая иммунная CAR-клетка не является Т-клеткой или NK-клеткой. В других вариантах осуществления субъекту вводят комбинацию различных типов иммунных CAR-клеток (например, NK-клеток и Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления иммунная CAR-клетка является аутологичной иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная CAR-клетка является аллогенной иммунной клеткой. Предпочтительно, в некоторых вариантах осуществления, иммунная клетка является Т-клеткой, а активность CAR-T-клетки не приводит к тому, что Т-клетка демонстрирует фенотип, связанный с истощением Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CAR-T-клетки включает CD8a, 41BB или CD28, а цитоплазматический домен включает альфа, бета или дзета-цепь Т-клеточного рецептора. Иммунную CAR-клетку и Адаптер могут вводить одновременно или последовательно в любом порядке. В некоторых

вариантах осуществления иммунную CAR-клетку и Адаптер вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления иммунную CAR-клетку и Адаптер вводят последовательно. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят после введения иммунной CAR-клетки. В некоторых вариантах осуществления Адаптер вводят к субъекту, которому ранее была введена иммунная CAR-клетка. В некоторых вариантах осуществления CAR включает р26-связывающий DD, который включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 70-73 или 92-94. В некоторых вариантах осуществления р26-связывающий DD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73.

[0619] В некоторых вариантах осуществления способа, раскрытого в настоящем изобретении, у пациента был диагностирован рак, и клетка-мишень является раковой клеткой. В одном варианте осуществления раковая клетка является клеткой рака предстательной железы, клеткой рака молочной железы, клеткой рака толстой и прямой кишки, клеткой рака легкого, клеткой остеогенной саркомы или клеткой глиобластомы. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам лечения рака. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является эндотелиальной клеткой.

[0620] Злокачественные опухоли, которые можно лечить, включают опухоли, которые не васкуляризированы или еще по существу не васкуляризированы, а также васкуляризированные опухоли. Злокачественные опухоли могут включать несолидные опухоли (такие как гематологические опухоли, например, лейкозы и лимфомы) или могут включить солидные опухоли. Типы злокачественных опухолей, подлежащих лечению, включают, без ограничения, рак, бластому и саркому, а также некоторые лейкозы или лимфоидные злокачественные опухоли, доброкачественные и злокачественные опухоли, и злокачественные новообразования, например, саркомы, карциномы и меланомы. Также включены опухоли/злокачественные опухоли взрослых и педиатрические опухоли/злокачественные опухоли.

[0621] В другом варианте осуществления способы, описанные в настоящем изобретении, могут быть использованы для лечения пациента, имеющего гемобластоз. Примеры гематологических (или гематогенных) злокачественных опухолей включают лейкозы, включая острые лейкозы (такие как острый лимфолейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, острый миелогенный лейкоз и миелобласты, промиелоцитарные, миеломоноцитарные, моноцитарные и эритролейкоз), хронические лейкозы (такие как хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз, хронический миелогенный лейкоз и хронический лимфолейкоз), истинную полицитемию, лимфому, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому (индолентные и высокозлокачественные формы), множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей, миелодиспластический синдром (например, миелодиспластический синдром высокого риска), волосатоклеточный лейкоз и миелодисплазию. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ),

миелодиспластический синдром (например, миелодиспластический синдром высокого риска), В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, лимфому Ходжкина или бластную плазмцитоидную дендритно-клеточную неоплазию (БПДКН). В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой ОМЛ. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой миелодиспластический синдром (например, миелодиспластический синдром высокого риска). В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой В-клеточный острый лимфобластный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой волосатоклеточный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой лимфому Ходжкина. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой бластную плазмцитоидную дендритно-клеточную неоплазию (БПДКН).

[0622] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рецидивирующий или рефрактерный рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рецидивирующий рак. В некоторых вариантах осуществления рак рецидивировал после химиотерапии. В некоторых вариантах осуществления рак рецидивировал после лечения биологическим средством. В некоторых вариантах осуществления биологическое средство представляет собой терапевтическое антитело или CAR-T-клетку. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рефрактерный рак. В некоторых вариантах осуществления рак является рефрактерным к химиотерапии. В некоторых вариантах осуществления рак является рефрактерным к лечению биологическим средством. В некоторых вариантах осуществления биологическое средство представляет собой терапевтическое антитело или CAR-T-клетку.

[0623] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рецидивирующий или рефрактерный гемобластоз. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рецидивирующий гемобластоз. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гемобластоз, рецидивировавший после химиотерапии. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гемобластоз, рецидивировавший после лечения биологическим средством. В некоторых вариантах осуществления биологическое средство представляет собой терапевтическое антитело или CAR-T-клетку. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гемобластоз, рецидивировавший после аутологичной трансплантации костного мозга. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гемобластоз, рецидивировавший после аллогенной трансплантации костного мозга. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гемобластоз, рецидивировавший после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). В некоторых вариантах осуществления ТГСК является аутологичной ТГСК. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рефрактерный гемобластоз. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гемобластоз, рефрактерный к химиотерапии. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гемобластоз, рефрактерный к лечению биологическим средством.

В некоторых вариантах осуществления биологическое средство представляет собой терапевтическое антитело или CAR-T-клетку. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), миелодиспластический синдром (например, миелодиспластический синдром высокого риска), В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, лимфому Ходжкина или бластную плазмцитоидную дендритно-клеточную неоплазию (БПДКН). В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой ОМЛ. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой миелодиспластическим синдромом (например, миелодиспластический синдром высокого риска). В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой В-клеточный острый лимфобластный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой волосатоклеточный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой лимфому Ходжкина. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой бластную плазмцитоидную дендритно-клеточную неоплазию (БПДКН). В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является В-клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является интактной Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является Т-клеткой памяти. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой миеломы. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой ОМЛ. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой миелодисплазии. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой В-клеточного острого лимфобластного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой волосатоклеточного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой лимфомы Ходжкина. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой бластной плазмцитоидной дендритно-клеточной неоплазии (БПДКН). В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является эндотелиальной клеткой.

[0624] В некоторых вариантах осуществления злокачественные опухоли и нарушения можно лечить с применением Адаптеров или CAR-клеток, которые нацелены на CD19, CD20, CD22 и ROR1. В одном определенном варианте осуществления CAR, Адаптер и/или комбинация CAR/Адаптера нацелены на CD22 и применяются для лечения В-клеточной лимфомы. В другом варианте осуществления CAR, Адаптер и/или комбинация CAR/Адаптера нацелены на CD19 и применяются для лечения злокачественных опухолей и нарушений, включающих, без ограничения перечисленными, пре-В-ОЛЛ (педиатрическое показание), ОЛЛ взрослых, мантийноклеточную лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому и терапию спасения после аллогенной трансплантации костного мозга. В другом варианте осуществления CAR, Адаптер и/или комбинация CAR/Адаптера нацелены на CS1 и применяются для лечения множественной миеломы. В другом варианте осуществления CAR, Адаптер и/или комбинация CAR/Адаптера нацелены

на ВСМА и применяются для лечения множественной миеломы. В другом варианте осуществления CAR, Адаптер и/или комбинация CAR/Адаптера нацелены на CS1 и ВСМА и применяются для лечения множественной миеломы.

[0625] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения субъекта, имеющего рак, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества иммунной CAR-клетки, включающей химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR включает мишень-связывающий домен, включающий D-домен, который специфично связывает CD123 (например, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100), трансмембранный домен и внутриклеточный домен (включающий сигнальный домен). В некоторых вариантах осуществления вводимая иммунная CAR-клетка является иммунной эффекторной клеткой. В некоторых вариантах осуществления вводимая иммунная CAR-клетка является Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления вводимая иммунная CAR-клетка является НК-клеткой. В некоторых вариантах осуществления вводимая иммунная CAR-клетка не является Т-клеткой или НК-клеткой. В других вариантах осуществления субъекту вводят комбинацию различных типов иммунных CAR-клеток (например, НК-клеток и Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления иммунная CAR-клетка является аутологичной иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная CAR-клетка является аллогенной иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления CD123-специфичный D-домен включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления CD123-специфичный DD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления CD123-специфичный DD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления CD123-специфичный DD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления CD123-специфичный DD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления CD123-специфичный DD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления CD123-специфичный DD включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления мишень-связывающий домен вводимой иммунной CAR-клетки специфично связывает CD123, экспрессируемый раковой клеткой субъекта, и вызывает генерацию иммунной CAR-клеткой цитотоксического сигнала, который приводит к цитотоксическим эффектам в отношении раковой клетки, обеспечивая, таким образом, лечение рака.

[0626] В некоторых вариантах осуществления, где CAR Т-клетки вводят субъекту, имеющему рак, связывание представляющей интерес мишени (например, CD123 или p26 АФП) стимулирует CAR-Т-клетку инициировать внутриклеточную сигнализацию. В других вариантах осуществления связывание CAR Т-клетки с представляющей интерес мишенью стимулирует Т-клетку инициировать внутриклеточную сигнализацию и

секретировать цитокины. В других вариантах осуществления связывание CAR Т-клетки с представляющей интерес мишенью стимулирует Т-клетку инициировать внутриклеточную сигнализацию, секретировать цитокины и производить дегрануляцию, что приводит к цитотоксическим эффектам в отношении раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления CAR-Т-клетка пролиферирует в ответ на связывание представляющей интерес мишени. Предпочтительно, в некоторых вариантах осуществления, активность CAR-Т-клетки не приводит к Т-клетке, демонстрирующей фенотип, связанный с истощением Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CAR-Т-клетки включает CD8a, 41BB или CD28, а цитоплазматический домен включает альфа, бета или дзета-цепь Т-клеточного рецептора.

[0627] В некоторых вариантах осуществления вводимый CAR дополнительно включает 2, 3, 4, 5 или больше 5 DD и/или другие связывающие домены (например, scFv), которые специфично связывают представляющую интерес мишень (например, CD123) экспрессируемую раковой клеткой. В дополнительных вариантах осуществления вводимый CAR дополнительно включает 2, 3, 4, 5 или больше 5 DD или другие связывающие домены (например, scFv), которые специфично связывают другую представляющую интерес мишень, экспрессируемую раковой клеткой. В дополнительных вариантах осуществления вводимый CAR дополнительно включает 2, 3, 4, 5 или больше 5 DD или другие связывающие домены (например, scFv), которые специфично связывают другую представляющую интерес мишень, экспрессируемую другой раковой клеткой или васкулярной эндотелиальной клеткой.

[0628] В некоторых вариантах осуществления вводимая иммунная клетка дополнительно включает второй полипептид CAR, содержащий DD или другой связывающий домен (например, scFv), который специфично связывает вторую представляющую интерес мишень, экспрессируемую раковой клеткой. В некоторых вариантах осуществления вводимая иммунная клетка дополнительно включает второй полипептид CAR, содержащий DD или другой связывающий домен (например, scFv), который специфично связывает вторую представляющую интерес мишень, экспрессируемую другой раковой клеткой или васкулярной эндотелиальной клеткой.

[0629] В некоторых вариантах осуществления введение иммунных клеток с CAR является внутривенным. В других вариантах осуществления иммунные клетки с CAR вводят внутриартериальным, внутримышечным, местным или другим приемлемым путем для данного плана лечения.

[0630] В дополнительных вариантах осуществления слитый белок DDpp связывает: (1) мишень на представляющей интерес клетке или ткани (например, опухолевый антиген на опухолевой клетке) и (2) мишень на эффекторной клетке, такую как молекула Т-клеточного рецептора. Согласно одному варианту осуществления связывание одной или более мишеней слитым белком DDpp используется для направления иммунного ответа против клетки, ткани или другого представляющего интерес участка у пациента. Например, в некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp специфично связывает мишень

на поверхности эффекторной клетки. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp специфично связывает мишень на поверхности Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления слитый белок DDpp специфично связывает CD3. В других вариантах осуществления слитый белок DDpp связывает CD2. В следующем варианте осуществления слитый белок DDpp связывает Т-клеточный рецептор (TCR). Согласно дополнительным вариантам осуществления слитый белок DDpp специфично связывается с мишенью на поверхности естественной киллерной клетки. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp специфично связывает рецептор NKG2D (естественных киллеров группы 2D). В дополнительных вариантах осуществления слитый белок DDpp специфично связывает CD16 (т.е. Fc-гамма RIII), CD64 (т.е. Fc-гамма RI) или CD32 (т.е. Fc-гамма RII).

[0631] В одном варианте осуществления слитый белок DDpp связывает мишень на лейкоците и опухолевый антиген на опухолевой клетке. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp связывает NKG2D. В дополнительном варианте осуществления слитый белок DDpp связывает NKG2D и мишень, выбранную из CD123, ErbB2, EGFR, IGF1R, CD19, CD20, CD80 и EPCAM. В одном варианте осуществления слитый белок DDpp связывает CD3. В конкретных вариантах осуществления DDpp специфично связывает CD3-эпсилон. В одном варианте осуществления слитый белок DDpp связывает CD4.

[0632] В одном варианте осуществления раскрытые DDpp-CAR применяются с целью направления трансдуцированных иммунных клеток (например, Т-клеток и/или НК-клеток) против опухолевой мишени, определяемой специфичностью связывания DDpp-CAR. В одном варианте осуществления первичные Т-клетки трансдуцируют лентивирусным вектором, кодирующим CAR, который объединяет в себе мишень-связывающий домен DD с трансмембранным доменом и внутриклеточным доменом CD3-дзета, CD28, 41BB. Таким образом, полученная в результате популяция трансдуцированных Т-клеток может вызывать Т-клеточный ответ, опосредуемый DDpp-CAR. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки генетически модифицированы для экспрессии DDpp-CAR, и Т-клетку DDpp-CAR вводят нуждающемуся в этом реципиенту. В дополнительных вариантах осуществления вводимая клетка способна убивать опухолевые клетки реципиента. Особенно выгодные свойства DDpp-CAR включают одно, несколько или все из следующих преимуществ: (i) специфичность связывания с мишенью, (ii) повышенная терапевтическая эффективность, (iii) снижение нецелевых побочных эффектов, (iv) возможность специфического подбора маркеров для конкретного пациента или группы пациентов, (v) улучшенная стабильность в процессе производства и обработки и (vi) способность адресно воздействовать на одну, две или более конкретных мишеней для усиления мишень-специфической терапии.

[0633] DDpp-CAR-модифицированные Т-клетки согласно настоящему изобретению можно вводить либо отдельно, либо в виде фармацевтической композиции в комбинации с разбавителями и/или другими компонентами, такими как химиотерапевтические средства,

антитела, цитокины или популяции клеток. Композиции, раскрытые в настоящем изобретении, предпочтительно составляют для внутривенного введения, которое можно производить один или более раз.

[0634] В некоторых вариантах осуществления способ доставки иммунного ответа к клетке-мишени у нуждающегося в этом пациента включает введение пациенту слитого белка DDpp (например, слитого белка DDpp на основе антитела), описанного в настоящем изобретении, включающего D-домен, который специфично связывается с CD123, и дополнительно включающего домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД) (например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела), который специфично связывается с комплексом Т-клеточного рецептора (TCR) на Т-клетках (например, эpsilon-цепью CD3). В некоторых вариантах осуществления способ уничтожения клетки-мишени у нуждающегося в этом пациента включает введение пациенту слитого белка DDpp (например, слитого белка DDpp на основе антитела), описанного в настоящем изобретении, включающего D-домен, который специфично связывается с CD123, и дополнительно включающего домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД) (например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела), который специфично связывается с комплексом Т-клеточного рецептора (TCR) на Т-клетках (например, эpsilon-цепью CD3). В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень экспрессирует CD123. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является раковой клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой острого миелоидного лейкоза (ОМЛ). В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой миелодисплазии. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой В-клеточного острого лимфобластного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой волосатоклеточного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой лимфомы Ходжкина. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является клеткой бластной плазмоцитоидной дендритно-клеточной неоплазии (БПДКН). В некоторых вариантах осуществления способ лечения рака включает введение нуждающемуся в этом пациенту слитого белка DDpp (например, слитого белка DDpp на основе антитела), описанного в настоящем изобретении, включающего D-домен, который специфично связывается с CD123, и дополнительно включающего домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД) (например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела), который специфично связывается с комплексом Т-клеточного рецептора (TCR) на Т-клетках (например, эpsilon-цепью CD3). В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гемобластоз. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), миелодиспластический синдром (например, миелодиспластический синдром высокого риска), В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, лимфому Ходжкина или бластную плазмоцитоидную дендритно-клеточную неоплазию (БПДКН). В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой ОМЛ. В некоторых вариантах осуществления, гемобластоз представляет собой

миелодиспластическим синдромом (например, миелодиспластический синдром высокого риска) В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой В-клеточный острый лимфобластный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой волосатоклеточный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой лимфому Ходжкина. В некоторых вариантах осуществления гемобластоз представляет собой бластную плазмоцитоидную дендритно-клеточную неоплазию (БПДКН). В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp представляет собой слитый белок DDpp на основе антитела. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp представляет собой слитый белок DDpp на основе антитела, способный демонстрировать цитотоксический эффект в отношении клетки-мишени посредством одновременного связывания с CD123 на клетке-мишени и с комплексом TCR (например, эpsilon-цепью CD3) на Т-клетках. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv), который связывается с комплексом TCR. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv), который связывается с CD3. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv), который связывается с эpsilon-цепью CD3. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который специфично связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который специфично связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который специфично связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который специфично связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который специфично связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который специфично связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который специфично связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33. Слитый белок DDpp (например, слитый белок DDpp на основе антител), раскрытый в настоящем изобретении, можно вводить либо отдельно, либо в виде фармацевтической композиции в комбинации с фармацевтически приемлемыми эксципиентами и/или с другими компонентами, такими как химиотерапевтические средства, антитела, цитокины или популяции клеток. Композиции, раскрытые в настоящем изобретении, предпочтительно составляют для внутривенного введения, которое можно производить один или более раз.

Е. Аналитические и диагностические применения

[0635] DDpp отдельно, в виде слитых белков, в виде химических конъюгатов или в

других вариантах осуществления, описанных в настоящем изобретении, имеет множество применений. В некоторых вариантах осуществления DDpp применяются в качестве реагентов для обнаружения, диагностических реагентов или аналитических реагентов. В некоторых вариантах осуществления DDpp применяются в качестве реагентов для обнаружения представляющих интерес мишеней в различных типах образцов. Некоторые варианты осуществления находят применение *in vivo*, *in vitro* и/или *ex vivo*. Способы, в которых применяется DDpp *in vitro*, могут быть реализованы в различных форматах, например, в микротитровальных планшетах, в белковых чипах, на поверхностях биосенсоров, на срезах тканей и в дополнительных форматах, которые будут известны специалисту в данной области.

[0636] В некоторых вариантах осуществления DDpp применяется для связывания, обнаружения и/или количественного определения представляющей интерес мишени (например, CD123) в образце, содержащем мишень. В одном варианте осуществления изобретение относится к способу обнаружения представляющей интерес мишени (например, CD123 или p26 АФП) в образце, включающий: (а) контакт образца с DDpp, содержащим DD, который включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100, который специфично связывает мишень, при условиях, подходящих для специфичного связывания DDpp с мишенью, с образованием комплекса мишени/DDpp и (б) обнаружение присутствия комплекса и/или связанной мишени. В некоторых вариантах осуществления DDpp иммобилизован на твердой подложке. В некоторых вариантах осуществления DD включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100, и DDpp применяется для связывания, обнаружения и/или количественного определения CD123 или слитого белка, включающего CD123, в образце.

[0637] Также предложен способ количественного определения представляющей интерес мишени (например, CD123) в образце, содержащем мишень, включающий: (а) контакт образца с DDpp, содержащим DD, который включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33 и 74-94, который специфично связывает мишень и иммобилизован на твердой подложке, при условиях, подходящих для специфичного связывания DDpp с мишенью, с образованием комплекса мишени/DDpp и (б) обнаружение присутствия комплекса мишени/DDpp и/или связанной мишени, где количественное обнаружение продукта указывает или может быть иным образом переведен в количество мишени или слитого белка, содержащего мишень, в образце.

[0638] В одном варианте осуществления DDpp применяются для обнаружения представляющей интерес мишени в растворах, используемых в производственных процессах, таких как экспрессия белка. Образцы могут включать, без ограничения, воду, буферы, образцы в процессе очистки, нефасованную лекарственную субстанцию и готовый фармацевтический продукт. В других дополнительных вариантах осуществления DDpp может применяться для обнаружения примесей из образца, такого как источник

водоснабжения или вода (или другая жидкость), используемые в производстве.

[0639] В другом варианте осуществления DDpp применяются для обнаружения представляющей интерес мишени в диагностических образцах. Образцы могут включать, без ограничения перечисленными, гомогенаты ткани, экстракты клеток, образцы биопсии, сыворотку, плазму, лимфу, кровь, фракции крови, мочу, синовиальную жидкость, спинномозговую жидкость, слюну, отделяемое слизистой, мокроту, плевральную жидкость, аспираты из соска, жидкость из дыхательных путей, кишечника и мочеполовых путей, слезную жидкость, грудное молоко, жидкость из лимфатической системы, сперму, спинномозговую жидкость, внутриорганный жидкость, асцитную жидкость, жидкость из опухолевой кисты, амниотическую жидкость и среды или лизат культивируемых клеток.

[0640] В одном варианте осуществления DDpp могут применяться для обнаружения присутствия фактора или множества факторов (например, антигенов или организмов) в биологическом образце. Термин "обнаружение" при использовании в настоящем изобретении охватывает количественное или качественное обнаружение. В некоторых вариантах осуществления биологический образец включает клетку, ткань или жидкость. В некоторых вариантах осуществления такие ткани включают нормальные и/или злокачественные ткани.

[0641] Различные форматы и методы обнаружения известны в уровне техники и включают, без ограничения перечисленными, Вестерн-блоттинг, иммуногистохимию, ИФА, FACS-анализ, ферментативные анализы, ауторадиографию и любые анализы связывания, указанные в настоящем изобретении.

[0642] В одном варианте осуществления предложен способ обнаружения представляющей интерес мишени (например, CD123 или p26 АФП) в растворе, содержащем мишень, включающий: (а) контакт раствора с DDpp, который специфично связывает представляющую интерес мишень, при условиях, подходящих для специфического связывания DDpp с мишенью, и (b) обнаружения связывания DDpp и мишени. DDpp может быть свободным или иммобилизованным. Для связывания представляющей интерес мишени и DDpp дается достаточное время, при этом необязательные компоненты в растворе или смеси удаляют или промывают. Образование комплекса связывания между DDpp и представляющей интерес мишенью затем может быть обнаружено, например, путем обнаружения сигнала от метки на DDpp, который является одним компонентом комплекса связывания. Метка может быть любой меткой, генерирующей сигнал, который можно обнаружить стандартными методами, такой как флуоресцентная метка, радиоактивное соединение или фермент, который реагирует с субстратом, генерируя поддающийся обнаружению сигнал. Примеры подходящих меток для таких целей описаны в настоящем изобретении и/или иным образом известны из уровня техники.

[0643] DDpp, которые связываются с представляющей интерес мишенью, такой как CD123 или p26 АФП, можно обнаруживать при использовании радиоизотопов, аффинных меток (таких как биотин, авидин и т.д.), ферментных меток (таких как пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза и т.д.) с использованием способов, известных в уровне техники,

например, описанных в WO 00/70023 и Harlow and Lane (1989) *Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory, pp.1-726.

[0644] Детектируемый маркер или метка могут быть любыми, которые способны генерировать, напрямую или непрямо, поддающийся измерению сигнал, такой как изменение массы, радиоактивный, хромогенный, люминесцентный или флуоресцентный сигнал, который может использоваться для количественного определения связанного детектируемого фрагмента или метки в образце. Детектируемые метки, известные в уровне техники, включают тяжелые металлы, радиоизотопы, такие как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I , электрохемилюминесцентные метки (такие как катализатор на основе рутения (Ru) в сочетании с субстратами и т.д.), люминесцентные или биолюминесцентные метки (например, европий, ванадий), флуоресцентные или хемилюминесцентные соединения, такие как флуоресцеинизотиоцианат, родамин или люциферин, ферменты (например, такой фермент, как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или пероксидаза хрена), колориметрические метки, такие как коллоидное золото, цветные стеклянные или пластиковые гранулы (например, полистирольные, полипропиленовые, латексные и т.д.), парамагнитные атомы или магнитные агенты, электронно-плотные реагенты, нано- или микросферы, содержащие флуоресцентный краситель, нанокристаллы, квантовая точка, квантовая сфера, нанометка, дендримеры с флуоресцентной меткой, микротранспондер, электронодонорная молекула или молекулярная структура, или светоотражающая частица, микрочастицы могут быть нанокристаллами или квантовыми точками. Нанокристаллы - это вещества, которые поглощают фотоны света, а затем испускают фотоны с другой длиной волны (флуорофоры). Кроме того, с нанокристаллы могут быть конъюгированы с дополнительными флуоресцентными метками или вторичными антителами. Нанокристаллы доступны в продаже из таких источников, как Invitrogen и Evident Technologies (Troy, N.Y.). Другие метки включают E-5-[2-(метоксикарбонил)этенил]цитидин, который представляет собой нефлуоресцентную молекулу, которая при облучении ультрафиолетом (УФ) дает продукт 3-бета-D-рибофуранозил-2,7-диоксопирид[2,3-d]пиримидин, который демонстрирует сильный сигнал флуоресценции.

[0645] Конкурентное ингибирование может быть определено любым способом, известным в данной области, например, с помощью конкурентного ИФА. Считается, что DDpp, такой как слитый белок DDpp (например, DDpp-Fc, DDpp-CAR, DDpp-scFv) или другая молекула, "конкурентно ингибирует" связывание референсной молекулы с данным эпитопом, если она связывается с этим эпитопом в такой степени, что в некоторой степени блокирует связывание референсной молекулы с эпитопом. При использовании в настоящем изобретении можно сказать, что DDpp (например, слитый белок DDpp) или другая молекула конкурентно ингибирует связывание референсной молекулы с данным эпитопом, например, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 30% или по меньшей мере на 20%. Термины "конкурирует", "способность

конкурировать" и "конкурирует с" являются относительными терминами, используемыми для описания DDpp, такого как слитый белок DDpp, который вызывает по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40% или по меньшей мере 50% ингибирование связывания референсной молекулы с мишенью посредством DDpp, такого как слитый белок DDpp (например, DDpp-Fc, DDpp CAR, DDpp-scFv и антитело, содержащее DDpp), как определено в стандартном конкурентном анализе, описанном в настоящем изобретении или иным образом известном в данной области техники, включая, помимо прочего, системы конкурентного анализа, в которых используются такие методики, как радиоиммуноанализы (РИА), иммуноферментные анализы (ИФА), предпочтительно твердофазный иммуноферментный анализ, "сэндвич" иммуноанализы, иммунорадиометрические анализы, флуоресцентные иммуноанализы, люминесцентные, электрохимические люминесцентные анализы и иммуноэлектрофоретические анализы. Способы определения связывания и аффинности потенциальных связывающих молекул известны в уровне техники и включают, без ограничения этим, аффинную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, равновесный диализ, вытеснение флуоресцентного зонда и плазменный резонанс.

[0646] В дополнительных вариантах осуществления предложенные DDpp применяются в анализе белков. В некоторых вариантах осуществления DDpp конъюгированы с детектируемым средством и/или меткой. В некоторых вариантах осуществления DDpp включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33 и 74-94. В других вариантах осуществления DDpp включает вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33 и 74-94. В некоторых вариантах осуществления DDpp конъюгирован с детектируемым средством. В одном варианте осуществления детектируемое средство включает хромоген. В другом варианте осуществления детектируемое средство включает флуоресцентный краситель. В дополнительном варианте осуществления детектируемое средство включает радионуклид. В некоторых вариантах осуществления DDpp конъюгирован с детектируемым средством путем ковалентного связывания. В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок. В дополнительных вариантах осуществления DDpp является мультимерным. В дополнительных вариантах осуществления DDpp конъюгирован с меткой. В некоторых вариантах осуществления метка представляет собой элемент, выбранный из группы, состоящей из: полигистидиновой метки, тус-метки и FLAG-метки. В дополнительных вариантах осуществления DDpp конъюгирован с комбинацией меток (например, полигистидиновой меткой и FLAG-меткой). В некоторых вариантах осуществления DDpp конъюгирован с меткой(ами) путем ковалентного связывания. В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок. В некоторых вариантах осуществления DDpp является мультимерным.

Изделия

[0647] Изобретение относится к изделиям, включающим наборы. Изделие может включать контейнер и этикетку или вкладыш в упаковку, находящиеся на контейнере или

связанные с ним. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы или шприцы. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит один или более DDpp, нуклеиновые кислоты, кодирующие DDpp, и/или векторы или клетки-хозяева согласно настоящему изобретению. Этикетка или вкладыш в упаковку могут содержать инструкции по проведению скрининга и/или обнаружения на основе аффинности.

[0648] Изобретение также относится к наборам, содержащим DDpp. Такие наборы находят применения, включающие, без ограничения этим, обнаружение представляющей интерес мишени, с которой специфично связывается DDpp (например, CD123 или р26 АФП). Такой набор для анализа может применяться в скрининге на присутствие представляющей интерес мишени и/или количественном определении концентраций представляющей интерес мишени в жидкости, такой как биологическая жидкость (например, кровь, сыворотка или синовиальная жидкость).

[0649] В некоторых вариантах осуществления набор, раскрытый в настоящем изобретении, включает клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR включает D-домен, который связывается с CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления CAR включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62-66 или 67. В некоторых вариантах осуществления CAR включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67. В некоторых вариантах осуществления клетка является иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является иммунной эффекторной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является Т-клеткой (CAR-Т-клеткой) или естественной киллерной (NK) клеткой (CAR-NK-клеткой). В некоторых вариантах осуществления иммунная CAR-клетка является аутологичной иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная CAR-клетка является аллогенной иммунной клеткой.

[0650] В некоторых вариантах осуществления набор, раскрытый в настоящем изобретении, включает клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR включает домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBD), который связывается с AD p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления ADBD, который связывается с AD p26 АФП, включает scFv, который связывается с AD p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления ADBD, который связывается с AD p26 АФП, включает D-домен, который связывается с AD p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-43 и 44. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления DD, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-93 и 94. В некоторых вариантах осуществления DD, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70-73 или 92-94. В некоторых вариантах осуществления DD, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73. В некоторых вариантах осуществления CAR включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления CAR включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69. В некоторых вариантах осуществления клетка является иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является иммунной эффекторной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является Т-клеткой (CAR-Т-клеткой) или естественной киллерной (NK) клеткой (CAR-NK-клеткой). В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка является аутологичной клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка является аллогенной иммунной клеткой.

[0651] В некоторых вариантах осуществления набор, раскрытый в настоящем изобретении, включает клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR включает антигенную детерминанту (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-43 и 44. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления клетка является иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является иммунной эффекторной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является Т-клеткой (CAR-Т-клеткой) или естественной киллерной (NK) клеткой (CAR-NK-клеткой). В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка является аутологичной клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка является аллогенной иммунной клеткой.

[0652] В некоторых вариантах осуществления набор, раскрытый в настоящем изобретении, включает Адаптер, включающий: (а) D-домен (DD), который связывается с CD123, и (b) антигенную детерминанту (AD). В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления Адаптер представляет собой моновалентный Адаптер, включающий один D-домен, который связывает CD123. В некоторых вариантах осуществления Адаптер представляет собой бивалентный Адаптер, включающий два D-домена, которые связывают CD123. В некоторых вариантах осуществления два D-домена, которые связывают CD123, являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления два D-домена, которые связывают CD123, являются разными. В некоторых вариантах осуществления Адаптер представляет собой бивалентный Адаптер, включающий первый D-домен, который связывает CD123, и второй D-домен, который связывает вторую AD. В некоторых вариантах осуществления вторым AD является CD33 или LeY. В некоторых вариантах осуществления моновалентный Адаптер включает D-домен, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления моновалентный Адаптер включает D-домен, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления бивалентный Адаптер включает DD, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления бивалентный Адаптер включает D-домен, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления бивалентный Адаптер включает два идентичных D-домена, включающие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления бивалентный Адаптер включает два идентичных D-домена, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает антигенную детерминанту (AD) p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-43 и 44. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления моновалентный Адаптер включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50-54 или 55. В некоторых вариантах осуществления моновалентный Адаптер включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления бивалентный Адаптер включает аминокислотную последовательность SEQ

ID NO: 56-60 или 61. В некоторых вариантах осуществления моновалентный Адаптер включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает один или более линкеров.

[0653] В некоторых вариантах осуществления набор, раскрытый в настоящем изобретении, включает Адаптер, включающий: (а) D-домен, который связывается с CD123, и (b) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывает AD p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-43 и 44. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-33, 99 и 100. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления ADBД, который связывается с AD p26 АФП, включает D-домен, который связывается с AD p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 70-73 и 92-94. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает один или более линкеров.

[0654] В некоторых вариантах осуществления набор, раскрытый в настоящем изобретении, включает Адаптер, включающий: (а) первый домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой-мишенью (AD) на клетке-мишени, и (b) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с AD p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-43 и 44. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления ADBД, который связывается с AD p26 АФП, включает D-домен, который связывается с p26 АФП. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 70-73 и 92-94. В некоторых вариантах осуществления D-домен, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73. В некоторых вариантах осуществления Адаптер включает один или более линкеров.

[0655] В одном варианте осуществления предусмотрен набор для анализа с DDpp, который включает один или более контейнеров с DDpp, который специфично связывает представляющую интерес мишень, и, необязательно, средства обнаружения для определения присутствия или отсутствия взаимодействия мишени/DDpp. Также набор необязательно содержит представляющий интерес белок-мишень (например, BCMA, CD123, CD33, CD38, LeY, CS1, HER2, АФП или р26 АФП), который может использоваться, например, в качестве контроля или стандарта. DDpp может быть свободным или может экспрессироваться на поверхности клетки-хозяина или на поверхности бактериофага. В конкретном варианте осуществления DDpp или представляющая интерес мишень, представленные в наборе, являются мечеными. Может использоваться любая метка, известная в уровне техники. В некоторых вариантах осуществления метка выбрана из группы, состоящей из биотина, флуорогена, фермента, эпитопа, хромогена или радионуклида. В некоторых вариантах осуществления DDpp иммобилизован на твердой подложке. Средства обнаружения, используемые для обнаружения метки, будут зависеть от природы метки и могут быть любыми известными в уровне техники, например, пленкой для обнаружения радионуклида; субстратом фермента, который дает или усиливает поддающийся обнаружению сигнал, позволяющий обнаружить присутствие представляющей интерес мишени.

[0656] Предпочтительно набор дополнительно включает твердую подложку для DDpp, которая может быть предоставлена как отдельный элемент или на которой DDpp, который специфично связывает представляющую интерес мишень (например, BCMA, CD123, CS1, HER2, АФП или р26 АФП), иммобилизован. Следовательно, DDpp, который специфично связывает представляющую интерес мишень, в наборе может быть иммобилизован на твердой поддержке, или они могут быть иммобилизованы на такой поддержке, включенной с набором или предоставленной отдельно от набора. Предпочтительно DDpp покрыт микротитровальный планшет. В некоторых вариантах осуществления обнаружение включает молекулу, усиливающую сигнал. Если усиливающей сигнал молекулой является фермент, то набор необязательно дополнительно включает субстраты и кофакторы, требуемые для фермента, а если усиливающей молекулой является флуорофор, набор необязательно дополнительно включает предшественник красителя, который дает детектируемый хромофор.

[0657] Набор также может содержать инструкции по проведению анализа, а также других добавок, таких как стабилизаторы, промывочные и инкубационные буферы, и т.п. Компоненты набора будут предоставлены в заданных соотношениях, причем относительные количества различных реагентов предпочтительно изменяются для обеспечения концентраций реагентов в растворе, которые существенно повышают чувствительность анализа. В частности, реагенты могут быть предоставлены в виде сухих порошков, обычно лиофилизированных, включая наполнители, которые при растворении образуют раствор реагента, имеющий соответствующую концентрацию для объединения с исследуемым образцом.

[0658] Различные форматы и методики анализа связывания, которые могут использоваться, известны в уровне техники и включают, без ограничения, иммобилизацию на фильтрах, таких как нейлон или нитроцеллюлоза; двумерные чипы, иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммуноанализ (РИА), анализы конкурентного связывания, прямые и непрямые сэндвич-анализы, иммунопреципитационные анализы, технология флуориметрического анализа в микрообъемах (FMAT™), анализы в системе Luminex™, резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET), резонансный перенос энергии биолюминесценции (BRET), электроиммуноанализы, AlphaScreen™, методы на основе наночастиц и поверхностный плазмонный резонанс (ППР).

[0659] Анализы связывания могут быть гомогенными или полугомогенными. Гомогенный анализ представляет собой анализ, в котором все компоненты смешивают, инкубируют, а затем исследуют. Полугомогенный анализ - это анализ, в котором большая часть реакции проходит в сложной смеси, однако требуется этап промывки перед добавлением конечного реагента и анализом, в отличие от типичного сэндвич-анализа поэтапной сборки, в котором каждый компонент добавляют, а затем смывают перед добавлением следующего компонента. В некоторых вариантах осуществления анализ представляет собой иммуноанализ. В некоторых вариантах осуществления анализ представляет собой полугомогенный иммуноферментный анализ (ИФА).

[0660] Далее различные варианты осуществления изобретения будут проиллюстрированы посредством описания экспериментов, проведенных в соответствии с ним. Представленные ниже примеры предназначены для облегчения применения раскрытых вариантов осуществления на практике и не должны рассматриваться как ограничивающие каким-либо образом остальную часть описания. В примерах приведены ссылки на прилагаемые фигуры.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Выделение вариантов D-доменов с повышенной аффинностью к CD123

[0661] Способы выделения и исследования D-доменов, которые связываются с примерами представляющих интерес мишеней, получения и исследования слитых полипептидов D-домена, включающих D-домены, получения и исследования Адаптеров, включающих D-домены, получения и исследования CAR-рецепторов, включающих D-домены, получения и исследования иммунных клеток, экспрессирующих CAR-рецепторы, и исследования цитотоксической активности клеток, экспрессирующих CAR-рецепторы с Адаптерами или без Адаптеров, раскрыты, например, в Публ. междунар. заявок WO 2016164305, WO 2016164308A1, WO 2019099440 и WO 2019099433, патентах США 10,662,248, 10,647,775 и 11,008,397, которые включены в настоящее описание путем ссылки во всех отношениях.

[0662] Способы повышения аффинности D-домена к антигену-мишени (например, CD123) могут включать мутагенез существующей аминокислотной последовательности. Эти мутации могут быть направлены на специфические аминокислоты или распределены

по последовательности случайным образом. Мутантные D-домены можно затем исследовать на предмет изменений характеристик связывания, экспрессии белка или другой биологической активности, связанной с конкретным применением или функцией. Одним из способов внесения случайных мутаций является ПЦР сниженной точности (EP-PCR). Данный подход использовали для введения мутаций в последовательность CD123-специфичного D-домена 8W9C (SEQ ID NO: 4). Вкратце, нуклеотидную последовательность, кодирующую D-домен и фланкирующие области, необязательно включающие сигнальные пептиды, линкерные пептиды и сайты рестриктаз, амплифицировали с помощью ПЦР с использованием фермента для ПЦР сниженной точности (например, Mutazyme II, Agilent Technologies). После одного или нескольких последовательных циклов амплификации продукт ПЦР расщепляли соответствующими эндонуклеазами рестрикции и лигировали по соответствующим сайтам либо в: 1) слитый вектор экспрессии с мальтозосвязывающим белком (MBP) для получения библиотеки MBP, либо в 2) слитый фаговый вектор экспрессии с белком рIII для получения фаговой библиотеки.

[0663] Исходный и мутантный варианты D-доменов экспрессировали в виде MBP-слитых конструкций в *E. coli* (T7 Express, New England Biolabs) путем индукции IPTG (изопропилтио- β -галактозидом) в течение 4 часов при 37°C в среде Луриа, содержащем антибиотики и 0,2% глюкозы, или путем аутоиндукции в течение 16 часов при 30°C с использованием MagicMedia (Life Technologies). После индукции клетки осаждали, промывали и ресуспендировали в "буфере для промывания", содержащем 200 мМ Трис, pH 7,5 и 20 мМ ЭДТА. После инкубирования при 30°C в течение 16 часов супернатант, содержащий MBP-слитые белки, исследовали с помощью ИФА как на связывание с мишенью, так и экспрессию. Супернатанты добавляли в 96-луночные микротитровальные планшеты Immulon 4НВХ, покрытые поликлональным антителом против MBP (Abcam) в концентрации 0,0032 мкг/мл. После промывки связавшиеся MBP-слитые белки детектировали либо с использованием CD123-Fc (Sino Biological) + HRP-конъюгат против Fc человека (Abcam) для оценки связывания CD123, либо с использованием HRP-конъюгат против MBP (New England Biolabs) для оценки экспрессии MBP-слитого белка. Как показано на Фигуре 1, мутантные варианты 8W9C (SEQ ID NO: 4) связываются с CD123 с различной аффинностью (ось y). 8W9C, 5S5W (SEQ ID NO: 97) и 5B7L (SEQ ID NO: 98) представляют собой исходные контрольные D-домены с низкой аффинностью и высокой аффинностью соответственно. Мутации также могут влиять на экспрессию домена, что было отражено переменным сигналом при обнаружении с использованием антитела к MBP (ось x).

[0664] Отобранные клоны MBP-слитых конструкций, которые демонстрировали повышенное связывание CD123 при скрининге, нормализовали по концентрации белка и дополнительно оценивали на связывание с CD123 посредством серийных разведений в ИФА. Как показано на Фигурах 2 и 3, несколько мутантов, включая 6Z5E (SEQ ID NO: 6) (т.е. 8W9C (N50S)), 4H2H (SEQ ID NO: 30) (т.е. 8W9C (K48I, K55N)) и 1J1K (SEQ ID NO:

30) (т.е. 8W9C (K48I, K55N)) и 1J1K (SEQ ID NO: 30) NO: 7) (т.е. 8W9C (G8S)) представляют последовательности, которые связывают CD123 с более высокой аффинностью, чем исходная последовательность 8W9C.

[0665] В альтернативе мутантные варианты 8W9C (SEQ ID NO: 4) подвергали дальнейшему эволюционному отбору перед скринингом. Для этого мутантные варианты 8W9C клонировали в виде библиотеки M13 фагового дисплея, кодирующей N-концевую слитую конструкцию D-домена с усеченным рIII. Полученную фаговую библиотеку подвергали двум раундам селекции связывания с биотинилированным рекомбинантным человеческим CD123-His (Sino Biological), сначала связанным с ВТ-трис-NTA-биотином, с последующим захватом на покрытых стрептавидином гранулах Dynabeads M-280 (Invitrogen). В последовательных раундах пэннинга использовали 10 нМ и 5 нМ антигена CD123-HIS с 0,1% Tween 20. Связанный фаг элюировали при добавлении 300 мкл 500 мМ имидазола в фосфатном буфере и размножали в клетках TG1 (Lucigen) с использованием хелперного фага VCSM13. (Agilent Technologies). Амплифицированный полученный фаг после каждого раунда затем осаждали ПЭГ/NaCl и ресуспендировали в PBS для использования в качестве вводной библиотеки для следующего раунда.

[0666] После двух раундов селекции полученные частицы фага сначала субклонировали в виде MBP-слитой библиотеки перед скринингом. Отдельные MBP клоны экспрессировались в виде MBP-слитых конструкций в *E.coli* BL21 (DE3) (New England Biolabs) посредством автоиндукции в течение 16 часов при 30°C с использованием MagicMedia (Life Technologies). После индукции клетки осаждали, промывали и ресуспендировали в 200 мМ Трис pH 7,5, 20 мМ ЭДТА (буфер для промывания). После инкубирования при 30°C в течение 16 часов супернатант, содержащий MBP-слитые белки, подвергали анализу как на связывание, так и экспрессию с помощью ИФА. Супернатанты добавляли в 96-луночные микротитровальные планшеты Immulon 4HBX, покрытые поликлональным антителом против MBP (Abcam) в концентрации 0,2 мкг/мл. После промывки связанные MBP-слитые белки детектировали с использованием CD123-HIS (Sino Biological) + HRP-конъюгат против HIS (BioLegend) для оценки связывания CD123. Было обнаружено, что мутации 0N5N (SEQ ID NO: 99) (т.е. 8W9C (I59L)) и 1H3C (SEQ ID NO: 100) (т.е. 8W9C (K46E)) обладают более высокой аффинностью к CD123, чем исходный домен 8W9C (данные не показаны).

[0667] Используя способы, описанные в публикации Qin, et. al, (Mol Ther. 27(7):1262-1274 (2019)), исходный CD123-связывающий D-домен 8W9C (SEQ ID NO: 4) деиммунизировали с получением D-домена 6T1D (SEQ ID NO: 5). Вкратце, последовательность 8W9C подвергали скринингу на присутствие T-клеточных эпитопов с использованием алгоритма предсказания на основе виртуальной матрицы для идентификации эпитопов II класса (Singh and Raghava, Bioinformatics. 17(12):1236-7 (2001)). Эпитопы с высокой аффинностью определяли как эпитопы, присутствующие с 6% порогом и ниже. В общей сложности в скрининге был проверен 51 аллель МНС HLA-DR. Универсальные эпитопы определяли как эпитопы с 17 или более совпадениями. Как

определено, 8W9C имеет три универсальных эпитопа с высокой аффинностью, которые расположены в Y12, W16 и I63. Клон 6T1D был создан путем введения трех мутаций R17Q, S24T, S65E, которые снизили количество высокоаффинных универсальных эпитопов до нуля. Эти мутации были направлены на удаление потенциальных Т-клеточных эпитопов МНС II типа, но без существенного влияния на аффинность домена к CD123.

[0668] Мутации, повышающие аффинность, которые были идентифицированы в контексте 8W9C (SEQ ID NO: 4), комбинировали с деиммунизирующими мутациями 6T1D с получением серии деиммунизированных вариантов с повышенной аффинностью. Следовательно, D-домены 3F4N (SEQ ID NO: 8), 6Y7D (SEQ ID NO: 9), 5M5U (SEQ ID NO: 10), 4R8U (SEQ ID NO: 11), 1F9I (SEQ ID NO: 12), 0C8S (SEQ ID NO: 13) и 5B1Q (SEQ ID NO: 14) представляют собой комбинации мутаций, которые демонстрируют более высокую аффинность связывания с CD123, чем 6T1D, без увеличения предсказанной иммуногенности, опосредуемой МНС II типа. Например, 5B1Q (SEQ ID NO: 14), полученный из 6T1D путем замены 5 остатков (т.е. G8S, L21Q, K48E, N50S, I59L), демонстрирует примерно 10-кратное повышение аффинности по сравнению с 6T1D, при этом он обладает предсказанной иммуногенностью, сравнимой с 6T1D.

[0669] Для оценки кинетики связывания CD123, белки Адаптеры, включающие D-домены, исследовали с использованием биослойной интерферометрии (BLI). Белки Адаптеры, включающие CD123-связывающий D-домен и полипептид p26 АФП (Q26-V229) (SEQ ID NO: 39), получали путем транзientной трансфекции клеток НЕК-293 с последующей Ni-Sepharose Excel (Cytiva) и SEC хроматографией. Эксперименты BLI проводили с использованием Octet RED386 (Sartorius). Все эксперименты проводили при 25°C в кинетическом буфере (PBS, 0,1% БСА, 0,02% Tween 20) при постоянном перемешивании на 1000 об/мин. CD123-Fc (20 нМ) захватывали на сенсоре АНС (Sartorius) в течение 250 секунд до плотности нагрузки ~0,8 нм. Для измерения аффинности связывания сенсоры погружали в белки Адаптеры с концентрацией от 500 нМ до 0,69 нМ (серии 3-кратных разведений) на 300 секунд, а затем возвращали в кинетический буфер на 600 секунд. Поверхность регенерировали 3 циклами по 10 секунд в 10 мМ глицина, pH 1,5, затем в кинетическом буфере. Данные анализировали с использованием глобального соответствия в модели взаимодействия 1:1 от Sartorius Octet Analysis studio. Репрезентативные измерения аффинности к CD123 показаны ниже.

Таблица 3. Аффинность связывания CD123 репрезентативных мутантных вариантов

Клон	SEQ ID NO:	Мутации	KD (нМ)	ka (1/Мс)	kdis (1/с)
0C8S	13	6T1D(G8S, K48E, N50S, I59L)	1,0	1,46E+05	1,51E-04
1F9I	12	6T1D(L21Q, I59L)	7,6	8,52E+04	6,46E-04
3F4N	8	6T1D(N50S)	1,3	2,13E+05	2,75E-04
4I0K	31	6T1D(W16S)	14	1,77E+05	2,52E-03
4R8U	11	6T1D(K48E, N50S)	1,2	2,54E+05	3,04E-04

5B1Q	14	6T1D(G8S, L21Q, K48E, N50S, I59L)	0,73	1,87E+05	1,36E-04
6K4C	111	6T1D(D5A)	18	1,97E+05	3,53E-03
6T1D	5	6T1D(R17Q, S24T, S65E)	7,6	1,39E+05	1,05E-03
8O3S	24	6T1D(W16T)	28	2,35E+05	6,65E-03
8W9C	4	дикий тип	5,2	1,77E+05	9,24E-04

[0670] Белки Адаптеры, включающие варианты D-домена 8W9C (SEQ ID NO: 4), дополнительно оценивали на предмет связывания с CD123-экспрессирующими клетками-мишенями. Все этапы проводили в буфере FCS (FBS+3% BSA) на льду. CD123-экспрессирующие клетки OCI-AML2 (1e6/мл) блокировали в буфере FCS в течение 20 минут, затем инкубировали с HIS-мечеными белками Адаптерами при концентрациях 100, 33, 11, 3,7, 1,2, 0,41, 0,14 и 0,046 мкг/мл в течение 30 мин. Клетки два раза промывали буфером FCS, затем Fc-рецепторы блокировали при инкубировании с раствором для блокирования Fc-рецепторов FcX Human TruStain (Biolegend) в течение 10 мин, после чего сразу проводили детектирование с использованием AF647-антитела против HIS (Biolegend) в течение 30 мин. Клетки два раза промывали буфером FCS, затем сразу же исследовали на проточном цитофлуориметре FACSCelesta (BD). Данные проточной цитометрии анализировали с использованием программы FlowJo и определяли MFI (среднюю интенсивность флуоресценции). Как показано на Фигуре 4, мутации, идентифицированные в скрининге на повышение связывания с рекомбинантным CD123 (например, G8S, K48E, N50S и I59L), способствуют повышению связывания с нативным CD123, экспрессируемым на поверхности опухолевых клеток.

Пример 2. Активность *in vitro* вариантов D-доменов с повышенной аффинностью к CD123

[0671] Для оценки влияния мутаций, повышающих аффинность, обнаруженных в контексте 8W9C (SEQ ID NO: 4), на повышение биологической активности белков Адаптеров, был проведен репортерный анализ Т-клеток. Репортерную линию клеток Jurkat NFAT (ядерный фактор активированных Т-клеток) (JNL10) получали путем трансдукции линии клеток Jurkat E6.1 (Sigma) репортером Signal Lenti NFAT, содержащим энхансер NFAT, связанный с репортерным геном люциферазы (Qiagen). Для оценки сигнальной активности NFAT репортерные клетки JNL10 трансфицировали путем электропорации конструкцией, кодирующей 8G8V-CAR (SEQ ID NO: 69), включающей р26 АФП-связывающий D-домен 8G8V (SEQ ID NO: 70), и культивировали при 37°C в течение ночи в 12-луночном планшете. На следующий день после электропорации клетки JNL10 совместно культивировали с CD123+ или CD123- клетками MOLM13 в соотношении примерно 1:1 в 100 мкл культуральной среды в 96-луночном планшете в течение 5 часов при 37°C, вместе с титрованными CD123-специфичными белками Адаптерами, включающими полипептид р26 и D-домены 6T1D, 3F4N или 4R8UD, SEQ ID NO: 101, 102 и 103 соответственно, разведенные в 10 мкл культуральной среды. После 5-часового инкубирования активность NFAT-опосредованной сигнализации наблюдали при

добавлении субстрата люциферазы Bright-Glo (Promega) и измерении относительных единиц люминесценции (RLU) с использованием микропланшетного ридера. Клетки JNL10/8G8V-CAR активировали Адаптером дозоспецифическим и мишеньспецифическим способом (Фигуры 5 и 6). Кроме того, по сравнению с исходным D-доменом (6T1D), Т-клетки JNL10/8G8V-CAR активировали при более низких концентрациях белками Адаптерами, включающими D-домены, которые связываются с CD123 с более высокой аффинностью, такие как 3F4N (SEQ ID NO: 8) и 4R8U (SEQ ID NO: 11). Как показано на Фигуре 6, активацию Т-клеток JNL10/8G8V-CAR не наблюдали в отсутствие экспрессии CD123 клетками-мишенями.

[0672] Продукция цитокинов может быть альтернативным показателем активации Т-клеток. Продукцию цитокинов оценивали при культивировании 8G8V-CAR- (SEQ ID NO: 69) экспрессирующих Т-клеток (7 дней после активации) клетками-мишенями MOLM13-GFP/Luc в 96-луночных планшетах. Через 24 часа супернатанты культур собирали и оценивали продукцию цитокинов с использованием наборов для ИФА Ready-Set-Go на IL2 и IFN γ человека без покрытия (eBioscience/ThermoFisher). Супернатанты культур разбавляли 1:5 перед ИФА. В присутствии CD123-экспрессирующих клеток-мишеней MOLM13, CD123-специфичные белки Адаптеры способствуют дозозависимой и аффиннозависимой продукции IL-2 (Фигура 7) и IFN (Фигура 8) первичными Т-клетками, экспрессирующими 8G8V-CAR. Кроме того, по сравнению с Адаптерами, включающими исходный D-домен (6T1D), Адаптеры, которые включают D-домены, которые связываются с CD123 с более высокой аффинностью, такие как 3F4N (SEQ ID NO: 8) и 4R8U (SEQ ID NO: 11), стимулировали 8G8V-CAR-Т-клетки секретировать больше цитокинов при более низких концентрациях Адаптеров.

[0673] Дополнительные мутации (например, G8S, L21Q и I59L), идентифицированные в скринингах после отбора из фаговой библиотеки, объединяли с мутациями, представленными выше (6T1D(K48E, N50S)), с получением D-доменов 0C8S (SEQ ID NO: 13) (т.е. 6T1D (G8S, K48E, N50S, I59L)) и 5B1Q (SEQ ID NO: 14) (т.е. 6T1D (G8S, L21Q, K48E, N50S, I59L)). При включении в Адаптер такие D-домены более эффективны, чем исходные варианты, что измеряли по активации NFAT (Фигура 9), лизису клеток-мишеней (Фигура 10) и продукции IFN γ (Фигура 11) и IL-2 (Фигура 12).

[0674] Комбинации аффинности и валентности D-доменов можно использовать для дальнейшего расширения динамического диапазона CD123-специфичных белков Адаптеров. Белки Адаптеры были созданы как в моновалентном, так и в бивалентном форматах с использованием исходного D-домена 6T1D (SEQ ID NO: 5) или вариантов, включающих высокоаффинные (например, 5B1Q (SEQ ID NO: 14)) или низкоаффинные (например, 4G0D (SEQ ID NO: 32)) варианты. Эти комбинации оценивали с использованием клона линии клеток NALM6, экспрессирующих повышенные уровни CD123 (NALM6-CD123+). Как показано на Фигуре 13, лизис NALM6-CD123+ клеток первичными Т-клетками, экспрессирующими 8G8V-CAR (SEQ ID NO: 69), можно модулировать дозой (концентрацией), валентностью (моно- или бивалентной) и аффинностью (высокой,

средней или низкой) CD123-связывающих белков Адаптеров, при этом в совокупности значения EC50 охватывают 3 log порядка. D-домены с низкой аффинностью (например, 4G0D) демонстрируют наибольшее повышение эффективности при включении в Адаптеры бивалентного формата. Однако моновалентный адаптер, включающий D-домен 5B1Q с высокой аффинностью, является более эффективным, чем бивалентный адаптер, включающий D-домен 6T1D.

Пример 3. Активность *in vivo* вариантов D-доменов с повышенной аффинностью к CD123

[0675] Эффективность *in vivo* Адаптеров, включающих варианты D-домена 8W9C (SEQ ID NO: 4) с улучшенной аффинностью, оценивали при использовании модели опухоли MOLM14-GFP/люцифераза. Опухолевые клетки (5×10^6) прививали путем внутривенной инъекции в хвостовую вену мышам NOD.Cg-Prkdcscid112rgtm1Wjl/SzJ (Jackson Laboratories). Через шесть дней после приживления опухоли, мышам вводили однократную дозу либо 5×10^6 CD123-специфичных Dd-X-CAR-экспрессирующих CD3-дефицитных Т-клеток, либо 5×10^6 CD3-дефицитных Т-клеток, экспрессирующих универсальный 8F7S-CAR (SEQ ID NO: 107). Нативные Т-клетки трансдуцировали лентивирусными векторами, кодирующими Dd-X-CAR или 8F7S-CAR, и конструкцией LentiCRISPRv2, кодирующей гРНК, нацеленную на константную область β -цепи TCR. После 7 дней экспансии оставшиеся CD3+/TCR $\alpha\beta$ + Т-клетки были элиминированы, а CD3-клетки размножились. Мышам, получающим 8F7S-CAR-Т-клетки, также в течение 28 дней вводили a3D-Адаптер отрицательного контроля (SEQ ID NO: 105) в дозе 1 мг/кг в/б, один раз в два дня, или CD123-специфичный Dd-X-Адаптер в дозе 1 мг/кг в/б, ежедневно, 1 мг/кг в/б, один раз в два дня, или 0,3 мг/кг в/б, один раз в два дня (Фигура 14). Животных наблюдали на предмет опухолевой нагрузки во время лечения и после отмены Адаптера. Опухолевую нагрузку измеряли путем внутрибрюшинной инъекции 3 мг D-люциферина (Caliper Life Sciences) с последующей визуализацией флуоресценции через 4 минуты с использованием Xenogen IVIS Lumina (Caliper Life Sciences) и времени экспозиции 1 минута. Программу Living Image версии 4.3.1 SP2 (Caliper Life Sciences) использовали для анализа светового потока биолюминесцентного сигнала (фотоны/с/см²/ср, нормированного при 10^5 - 10^7) для каждой мыши. При измерении флуоресцентного потока, контроль опухоли с использованием высокоаффинного моновалентного CD123-специфичного белка Адаптера в комбинации с универсальными Т-клетками 8F7S-CAR сопоставим с результатами в группе лечения CD123-специфичными CAR-Т-клетками. Лечение приводило к полной регрессии диссеминированных опухолей MOLM14 по схеме и в зависимости от дозы без поддержки аллореактивности.

[0676] Лечение Т-клетками с использованием варианта D-домена 8W9C (SEQ ID NO: 4) с повышенной аффинностью приводило к полной регрессии диссеминированных опухолей MV4-11 дозозависимым образом в модели на животных. Мышам NOD.Cg-Prkdcscid112rgtm1Wjl/SzJ (Jackson Laboratories) прививали 5×10^6 опухолевых клеток MV4-11. Через пятнадцать дней после приживления опухоли мышам вводили однократную дозу

либо 5×10^6 CD123-специфичных Dd-X-CAR-экспрессирующих CD3-дефицитных Т-клеток, либо 5×10^6 экспрессирующих универсальный 8F7S-CAR (SEQ ID NO: 107) CD3-дефицитных Т-клеток. Мышам, получавшим 8F7S-CAR-Т-клетки, также в течение 28 дней вводили a3D-Адаптер (SEQ ID NO: 105) отрицательного контроля в дозе 1 мг/кг в/б, ежедневно, или CD123-специфичный Dd-X-Адаптер в дозе 1 мг/кг в/б, ежедневно, 0,3 мг/кг в/б, ежедневно, или 0,1 мг/кг в/б, ежедневно (Фигура 15). Животных наблюдали на предмет опухолевой нагрузки во время лечения и после отмены Адаптера. При измерении флуоресцентного потока, контроль опухоли с использованием высокоаффинного моновалентного CD123-специфичного белка Адаптера в комбинации с универсальными 8F7S-CAR-Т-клетками сопоставим с результатами в группе лечения CD123-специфичными CAR-Т-клетками. Лечение привело к полной регрессии диссеминированных опухолей MV4-11 по схеме и в зависимости от дозы.

[0677] Лечение Т-клетками с использованием варианта D-домена 8W9C (SEQ ID NO: 4) с повышенной аффинностью приводило к устранению или контролю множественных, полученных у пациента ксенотрансплантатов ОМЛ (PDX). Создание моделей ОМЛ-PDX: Перед инокуляцией клеток ОМЛ, животные получали сублетальную дозу облучения всего тела 150 сГр с последующим переносом 2×10^6 человеческих клеток ОМЛ, обедненных Т-клетками, полученных из криоконсервированных образцов лейкофереза пациента. Реципиентная линия (NOG, NOG-EXL и NCG) была создана ранее и показана на Фигуре 16 вместе с данными пациента и сведениями о заболевании. Кинетику приживления модели устанавливали для определения временного окна, в котором у животных наблюдали 20% или большее приживление человеческих опухолевых клеток в костном мозге. Для каждой модели суррогатную когорту животных ($n=3-5$) умерщвляли в промежуточных точках времени до предполагаемого окна приживления для сбора костного мозга с целью анализа нагрузки ОМЛ. Как только суррогатные животные достигали критерия приживления в костном мозге, определяемого как %hCD45+ жизнеспособных клеток $\geq 20\%$ в среднем животных, у которых забирали образцы, оставшихся до исследования животных рандомизировали по массе тела для начала лечения. Все участвовавшие в исследовании животные получали однократную дозу 8F7S-CAR-Т-клеток, созданных из Т-клеток здорового донора, с последующими в/б инъекциями один раз в день отрицательного контроля a3D, либо CD123-специфичного Dd-X Адаптера в дозе 3 мг/кг в течение 14 дней. В день 14 после начала лечения животных во всех группах усыпляли для сбора костного мозга с целью исследования методом проточной цитометрии. Процент живых клеток в костном мозге, которые составляли приживленные клетки ОМЛ (hCD45+CD3-), определяли у всех животных, участвующих в исследовании.

[0678] Все цитируемые публикации, патенты, заявки на патент, интернет-сайты и номера доступа/последовательности в базах данных (включая полинуклеотидные и полипептидные последовательности) полностью включены в настоящее описание путем ссылки во всех отношениях, в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент, заявка на патент, интернет-сайт или номер доступа/последовательность в базе

данных были прямо и индивидуально указаны как включенные в качестве ссылки.

[0679] Предполагается, что различные комбинации или подкомбинации конкретных признаков и аспектов, раскрытых выше, могут быть выполнены, и при этом будут по-прежнему включены в рамки вариантов осуществления, охватываемых изобретением. Кроме того, раскрытие любого конкретного признака, аспекта, способа, свойства, характеристики, качества, атрибута, элемента и т.п. в связи с вариантом осуществления может использоваться во всех других вариантах осуществления, изложенных в настоящем изобретении. Таким образом, следует понимать, что различные признаки и аспекты раскрытых вариантов осуществления могут быть объединены или заменены друг другом с формированием различных типов раскрытых вариантов осуществления. Таким образом, предполагается, что объем вариантов осуществления, охватываемых настоящим изобретением, не должен ограничиваться конкретными раскрытыми вариантами осуществления, описанными в настоящем изобретении. Более того, хотя рассматриваемые варианты осуществления допускают различные модификации и альтернативные формы, их конкретные примеры показаны на чертежах и подробно описаны в настоящем изобретении. Впрочем, следует понимать, что объем изобретения не должен ограничиваться конкретными раскрытыми формами или способами, а наоборот, изобретение должно охватывать все модификации, эквиваленты и альтернативы, входящие в сущность и объем различных описанных вариантов осуществления и прилагаемой формулы изобретения. Любые способы, раскрытые в настоящем изобретении, не должны обязательно выполняться в указанном порядке. Раскрытые в настоящем изобретении способы включают определенные действия, предпринимаемые практикующим специалистом; однако они также могут включать любые инструкции третьих лиц по выполнению таких действий, прямые или подразумеваемые. Например, такие действия, как "введение Т-клетки, включающей DDrp-CAR", включают "инструкции по введению Т-клетки, включающей DDrp-CAR". Кроме того, когда признаки или аспекты изобретения описываются посредством групп Маркуша, для специалистов в данной области будет очевидным, что изобретение также описывается, таким образом, посредством любого отдельного элемента или подгруппы элементов группы Маркуша.

[0680] Диапазоны, раскрытые в настоящем изобретении, также охватывают все перекрытия, поддиапазоны и их комбинации. Такие выражения, как "до", "по меньшей мере", "больше", "меньше", "между" и т.п., включают указанное число. Числа, которым предшествует такой термин, как "приблизительно" или "примерно", включают указанные числа. Например, "приблизительно 10 нанометров" включает "10 нанометров".

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид мишень-связывающего домена D-домена, который специфично связывает CD123 и включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, 8-13, 15-32 или 33.

2. Полипептид, включающий D-домен по п.1, слитый с гетерологичным полипептидом, где гетерологичный полипептид необязательно включает:

- (a) полноразмерное антитело или фрагмент антитела;
- (b) Fc-домен;
- (c) трансмембранный домен;
- (d) мембраносвязанный домен;
- (e) человеческий сывороточный альбумин или его фрагмент;
- (f) АФП или его фрагмент;
- (g) р26 АФП или его фрагмент; или
- (h) внеклеточный домен рецептора или его фрагмент.

3. Полипептид по п.1 или п.2, меченый или конъюгированный с терапевтическим или цитотоксическим средством.

4. Химерный антигенный рецептор (CAR), включающий мишень-связывающий домен, включающий D-домен, который специфично связывает CD123, по п.1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, где, необязательно:

(a) трансмембранный домен включает трансмембранный домен CD8a, 41BB или CD28;

(b) внутриклеточный сигнальный домен выбран из группы, состоящей из домена альфа, бета или дзета-цепи T-клеточного рецептора человека; домена 41BB человека; домена CD28 человека; и их любой комбинации; и/или

(c) внутриклеточный сигнальный домен включает внутриклеточный домен костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, 41BB, OX40, CD30, CD40, PD1, лимфоцитарного функционально-ассоциированного антигена 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, NKG2D, B7-H3, лиганда, который специфично связывается с CD83, и их любой комбинации.

5. CAR по п.4, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62-66 или 67.

6. Адаптер, включающий: (a) мишень-связывающий домен D-домен по п.1, который специфично связывает CD123, и (b) антигенную детерминанту (AD), где AD необязательно включает полипептид р26 АФП, где полипептид р26 АФП необязательно включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-43 и 44.

7. Адаптер по п.6, где Адаптер включает один D-домен, который специфично связывает CD123, или два D-домена, которые специфично связывают CD123.

8. Выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид по п.1 и п.2 или Адаптер по п.6 или п.7.

9. Выделенный полинуклеотид, кодирующий CAR по любому из пп. 3-5.
10. Клетка, генно-инженерно модифицированная для экспрессии CAR по любому из пп. 3-5, где клетка необязательно является Т-клеткой или естественной киллерной (NK) клеткой.
11. Фармацевтическая композиция, включающая белок по п.1 и п.2 или Адаптер по п.6 или п.7 и фармацевтически приемлемый эксципиент.
12. Фармацевтическая композиция, включающая клетку, экспрессирующую CAR по любому из пп. 3-5, и фармацевтически приемлемый эксципиент, где клетка, необязательно является Т-клеткой или естественной киллерной (NK) клеткой.
13. Способ доставки иммунного ответа к одной или более клеткам-мишеням или уничтожения клетки-мишени, включающий контакт композиции, включающей клетку-мишень, с клеткой, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR) по любому из пп. 3-5, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен.
14. Способ доставки иммунного ответа к клетке-мишени или уничтожения клетки-мишени, включающий: контакт композиции, включающей клетку-мишень, с Адаптером, где: (a) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает клетку, экспрессирующую CAR, где CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) Адаптер включает: (i) D-домен, который связывается с CD123 по п.1, и (ii) AD p26 АФП.
15. Способ уничтожения клетки-мишени, включающий: контакт композиции, включающей клетку-мишень, с клеткой, экспрессирующей CAR, где: (a) CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) композиция, включающая клетку-мишень, дополнительно включает Адаптер, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123 по п.1, и (ii) AD p26 АФП.
16. Способ уничтожения клетки-мишени, включающий: контакт композиции, включающей клетку-мишень, с клеткой, экспрессирующей CAR и Адаптер, где: (a) CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; и (b) Адаптер включает: (i) D-домен, который связывается с CD123 по п.1, и (ii) AD p26 АФП.
17. Способ доставки иммунного ответа к клетке-мишени, уничтожения клетки-мишени или лечения рака у пациента, включающий: введение пациенту клетки, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR) по п.3 или п.4, включающий: (i) D-домен, который связывается с CD123, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен.
18. Способ доставки иммунного ответа к клетке-мишени, уничтожения клетки-

мишени или лечения рака у пациента, включающий: введение пациенту Адаптера, включающего: (i) D-домен, который связывается с CD123 по п.1, и (ii) AD p26 АФП.

19. Способ по п.18, где:

(a) пациенту была введена клетка, экспрессирующая CAR, где CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен;

(b) пациент включает клетку, экспрессирующую CAR, где CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен; или

(c) способ дополнительно включает введение клетки, экспрессирующей CAR, где CAR включает: (i) домен, связывающий антигенную детерминанту (ADBД), который связывается с антигенной детерминантой (AD) p26 АФП, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен.

20. Способ по любому из пп. 13-19, где:

(a) D-домен, который связывается с CD123, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 14, 31, 32 и 33;

(b) D-домен, который связывается с последовательностью аминокислот CD123 включает SEQ ID NO: 14;

(c) трансмембранный домен включает трансмембранный домен CD8a, 41BB или CD28;

(d) внутриклеточный сигнальный домен выбран из группы, состоящей из домена альфа, бета или дзета-цепи Т-клеточного рецептора человека; домена 41BB человека; домена CD28 человека; и любая комбинация этого;

(e) внутриклеточный сигнальный домен включает внутриклеточный домен костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, 41BB, OX40, CD30, CD40, PD1, лимфоцитарного функционально-ассоциированного антигена 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, NKG2D, B7-H3, лиганда, который специфично связывается с CD83, и их любой комбинации;

(f) AD p26 АФП включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-43 и 44;

(g) ADBД, который связывается с AD p26 АФП, включает D-домен, который связывается с AD p26 АФП;

(h) ADBД, который связывается с AD p26 АФП, включает D-домен, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73, 70-72 или 92-94;

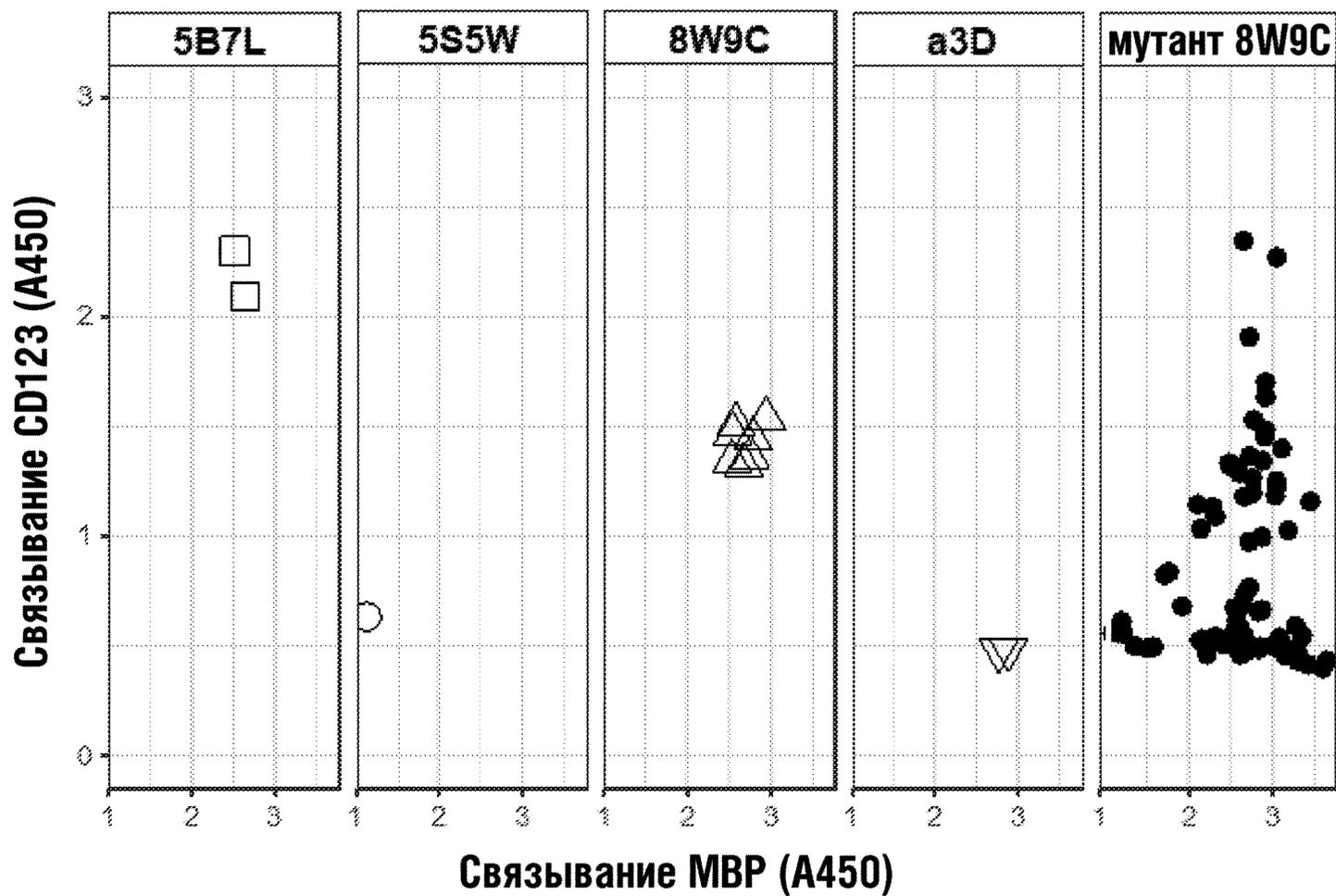
(i) CAR, включающий D-домен, который связывается с AD p26 АФП, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 или 69;

(j) клетка, экспрессирующая CAR, является иммунной клеткой, необязательно Т-клеткой или естественной киллерной (NK) клеткой;

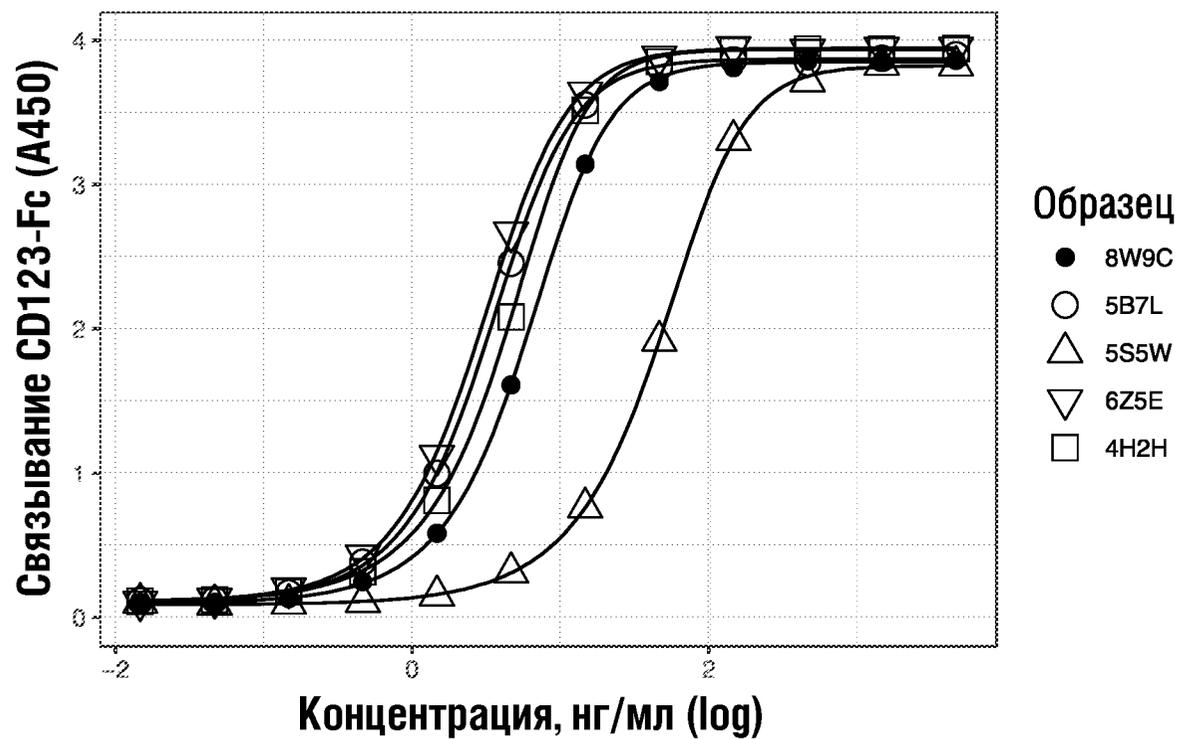
- (k) контакт происходит в организме субъекта-человека;
- (l) клетка, экспрессирующая CAR, является аутологичной иммунной клеткой;
- (m) клетка-мишень является раковой клеткой; и/или
- (n) рак является острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) или миелодиспластическим синдромом высокого риска.

По доверенности

ФИГ.1

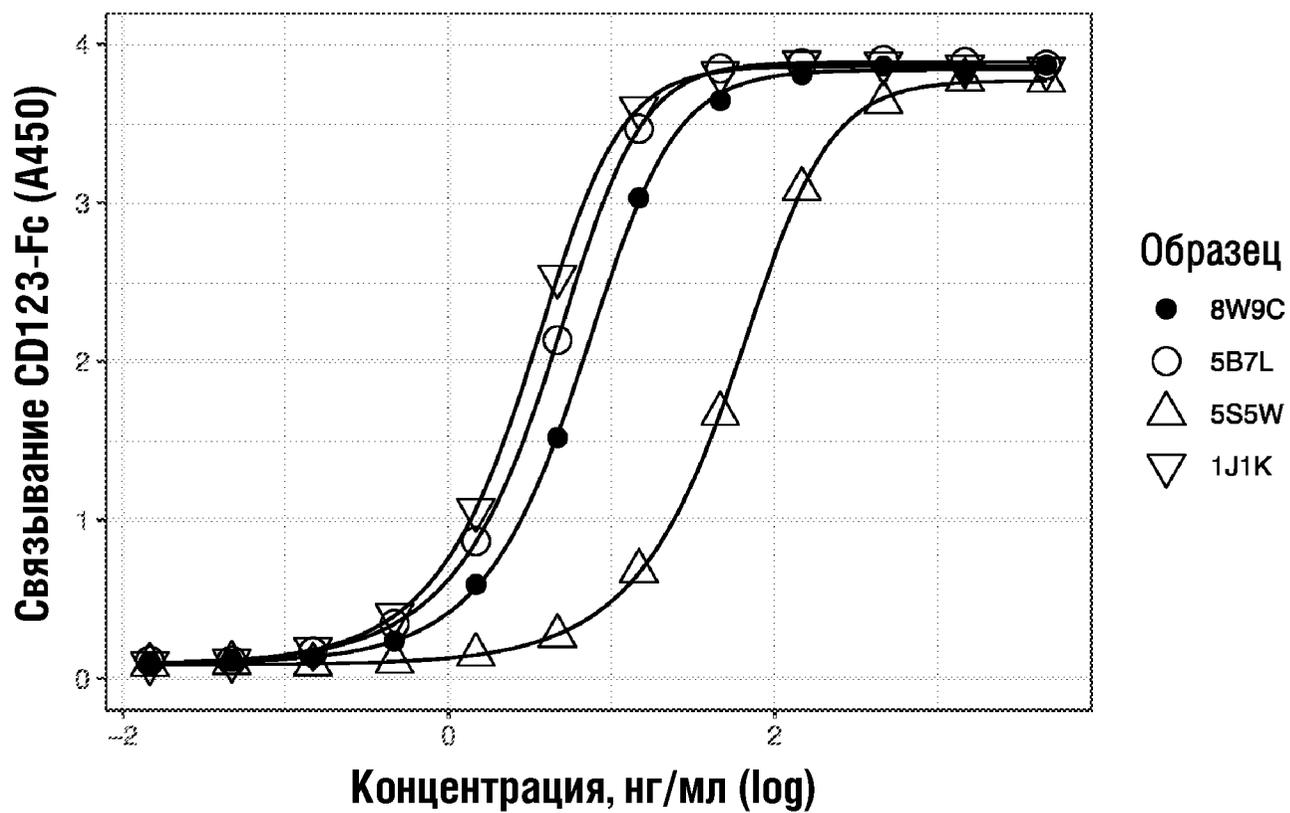


ФИГ.2



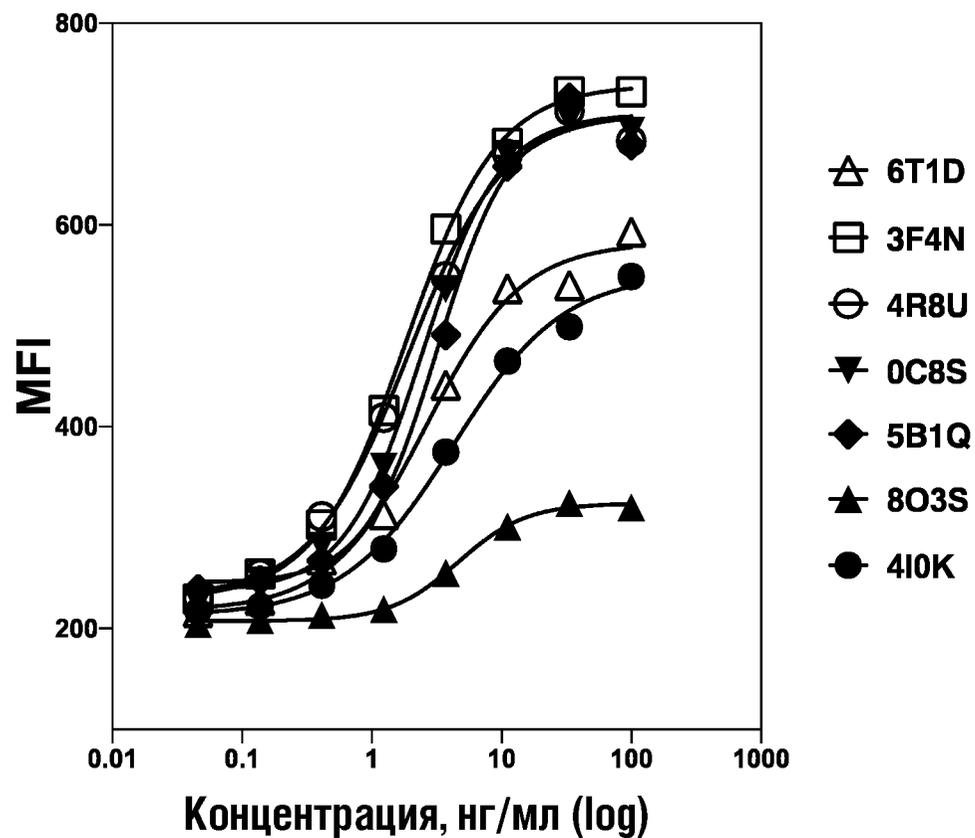
МВР-слитый белок	8W9C	5B7L	5S5W	8W9C (N50S)	8W9C (K48I,K55N)
EC50 (нг/мл)	6.97	3.72	57.90	3.26	5.40

ФИГ.3



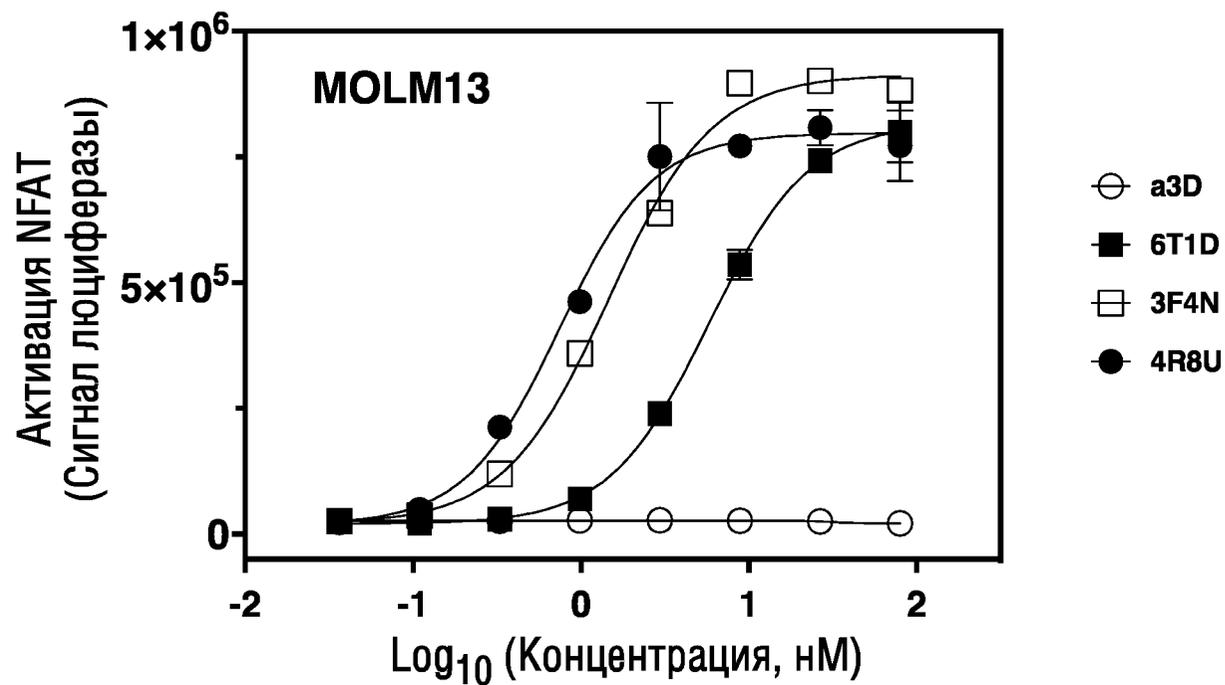
МВР-слитый белок	8W9C	5B7L	5S5W	8W9C (G8S)
EC50 (нг/мл)	7.47	5.12	68.69	3.69

ФИГ.4



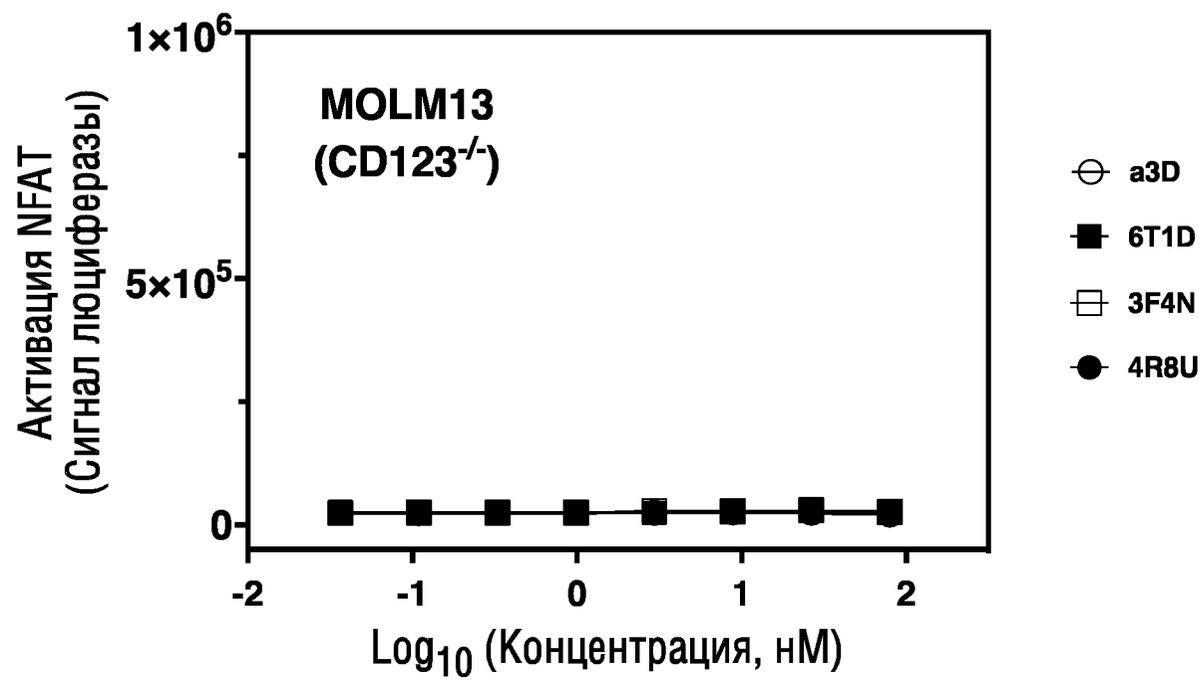
Связывание клеток OCL-AML2							
ID	4I0K	8O3S	0C8S	4R8U	3F4N	6T1D	5B1Q
Мутации	6T1D (W16S)	6T1D (W16T)	6T1D (G8S, K48E, N50S, I59L)	6T1D (K48E, N50S)	6T1D (N50S)	6T1D	6T1D (G8S, L21Q, K48E, N50S, I59L)
EC50 (мкг/мл)	4.260	4.623	2.444	1.902	1.831	2.606	3.217

ФИГ.5

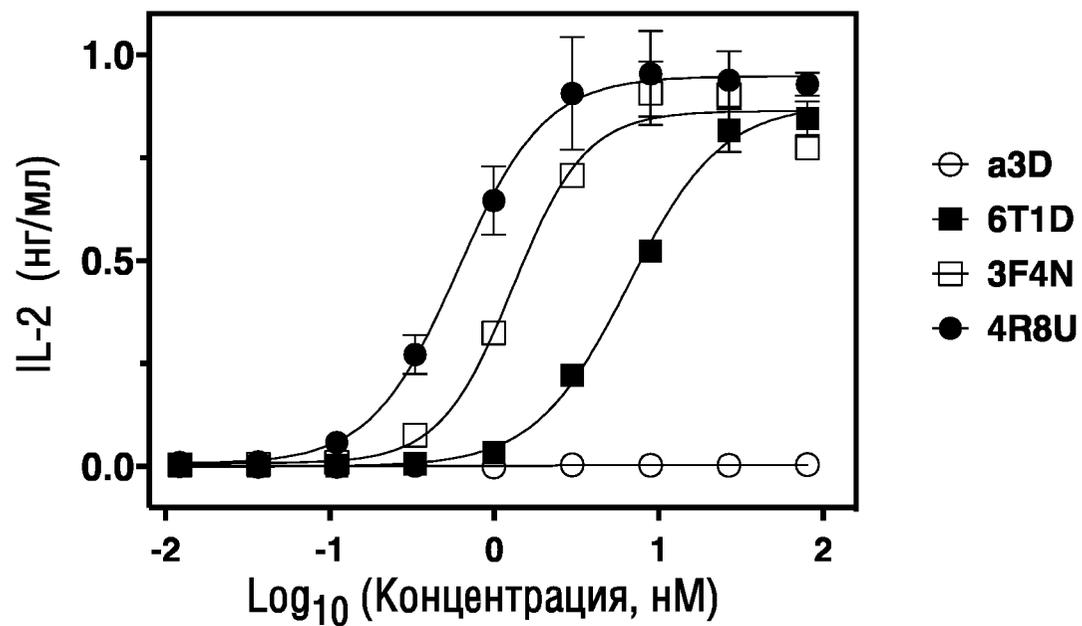


	EC50 (нМ)			
ID	a3D	6T1D	3F4N	4R8U
Мутации	na	6T1D	6T1D (N50S)	6T1D (K48E, N50S)
Активация NFAT	na	5.799	1.464	0.744

ФИГ.6

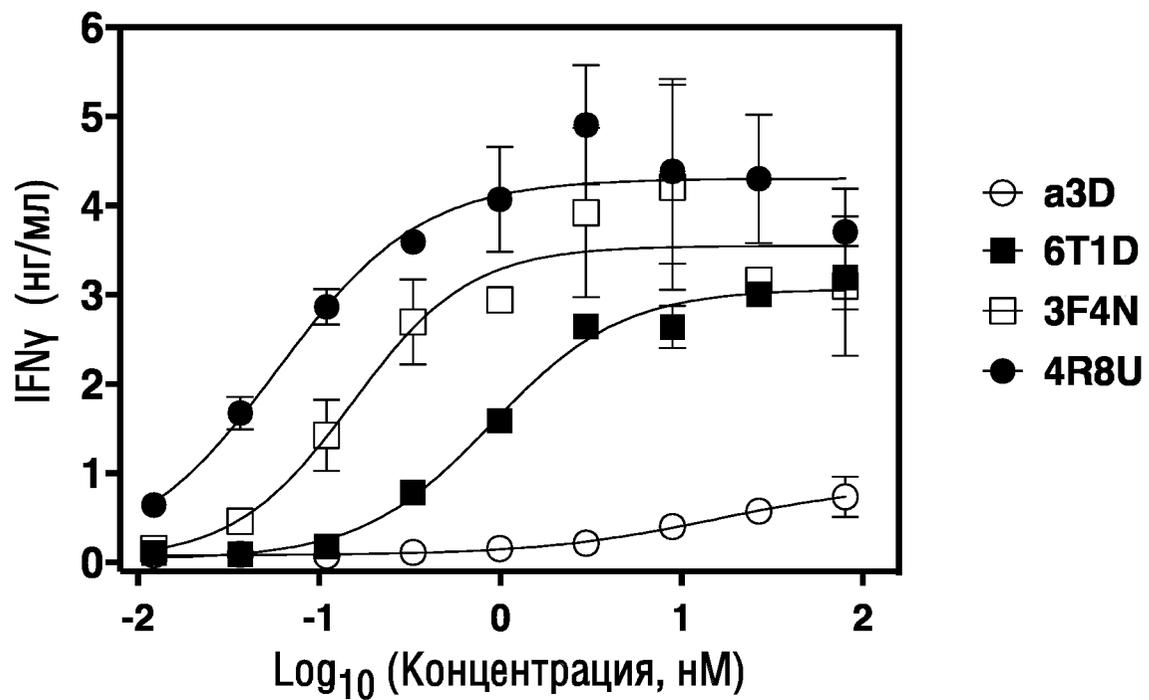


ФИГ.7



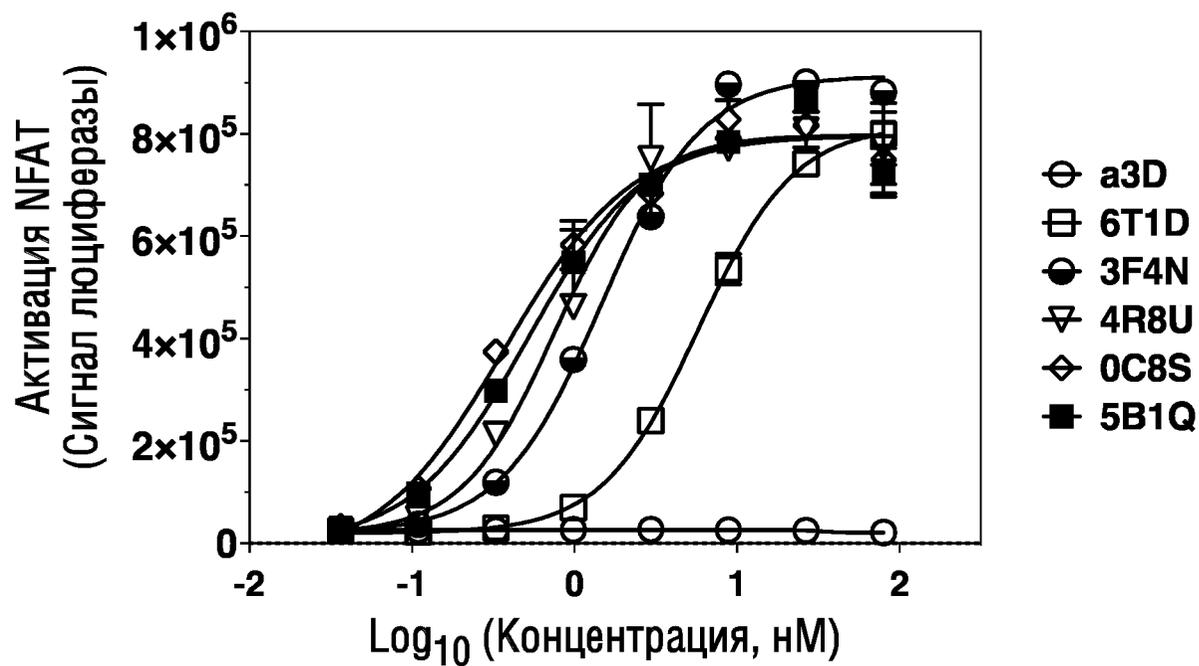
	EC50 (нМ)			
ID	a3D	6T1D	3F4N	4R8U
Мутации	na	6T1D	6T1D (N50S)	6T1D (K48E, N50S)
IL-2	na	6.511	1.299	0.600

ФИГ.8



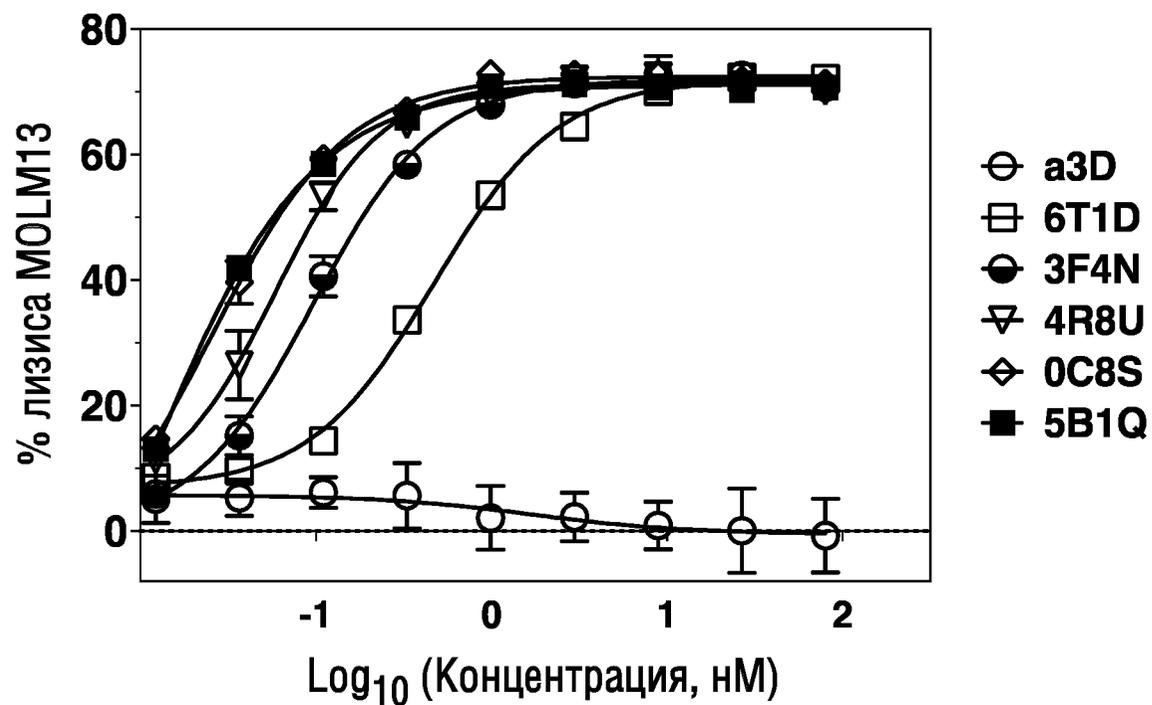
	EC50 (нМ)			
ID	a3D	6T1D	3F4N	4R8U
Мутации	na	6T1D	6T1D (N50S)	6T1D (K48E, N50S)
IFN γ	na	0.894	0.152	0.059

ФИГ.9



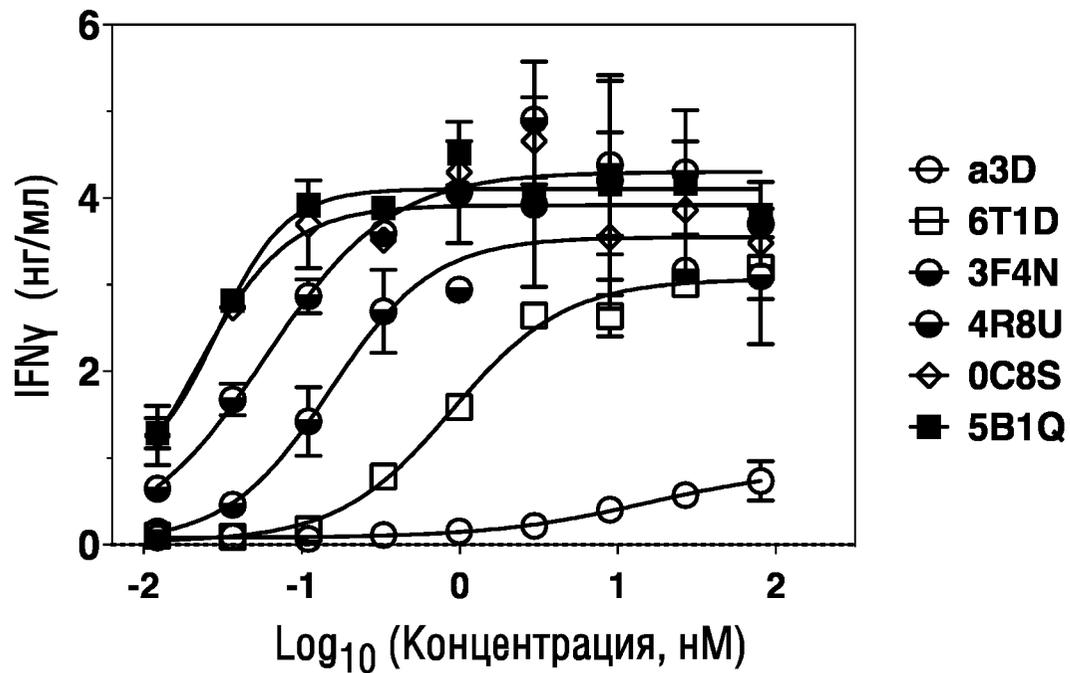
ID	a3D	6T1D	3F4N	4R8U	0C8S	5B1Q
Мутации	a3D	6T1D	6T1D (N50S)	6T1D (K48E, N50S)	6T1D (G8S, K48E, N50S, I59L)	6T1D (G8S, L21Q, K48E, N50S, I59L)
Активация NFAT	na	5.799	1.464	0.744	0.373	0.513

ФИГ.10



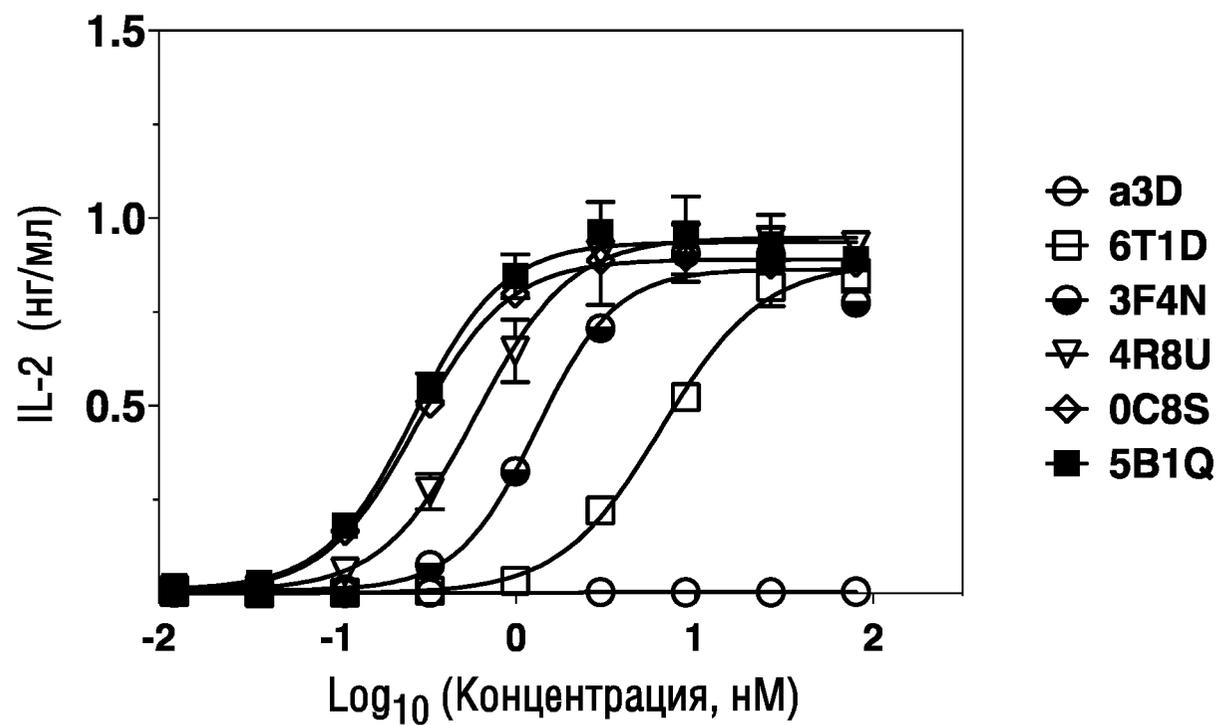
ID	a3D	6T1D	3F4N	4R8U	0C8S	5B1Q
Мутации	a3D	6T1D	6T1D (N50S)	6T1D (K48E, N50S)	6T1D (G8S, K48E, N50S, I59L)	6T1D (G8S, L21Q, K48E, N50S, I59L)
Цитотоксичность	na	0.471	0.096	0.059	0.025	0.011

ФИГ.11



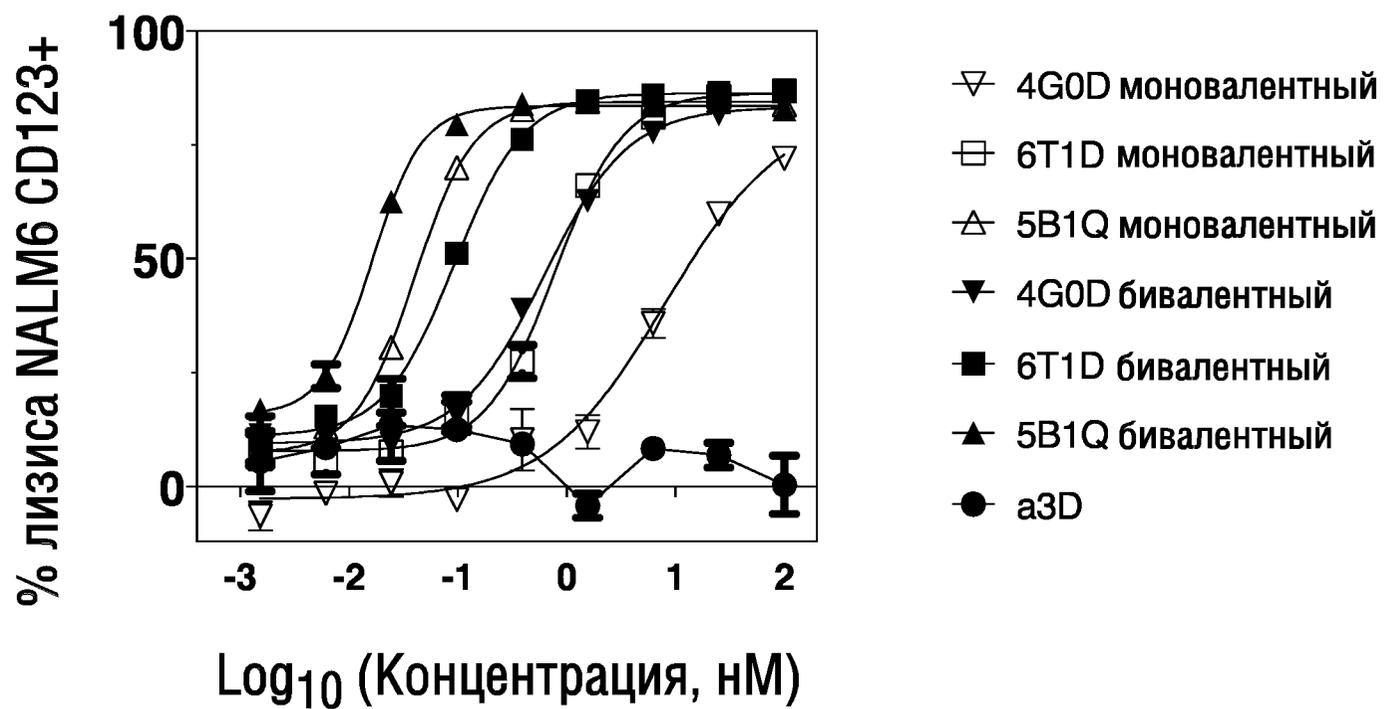
ID	a3D	6T1D	3F4N	4R8U	0C8S	5B1Q
Мутации	a3D	6T1D	6T1D (N50S)	6T1D (K48E, N50S)	6T1D (G8S, K48E, N50S, I59L)	6T1D (G8S, L21Q, K48E, N50S, I59L)
IFN γ	na	0.894	0.152	0.059	0.021	0.029

ФИГ.12

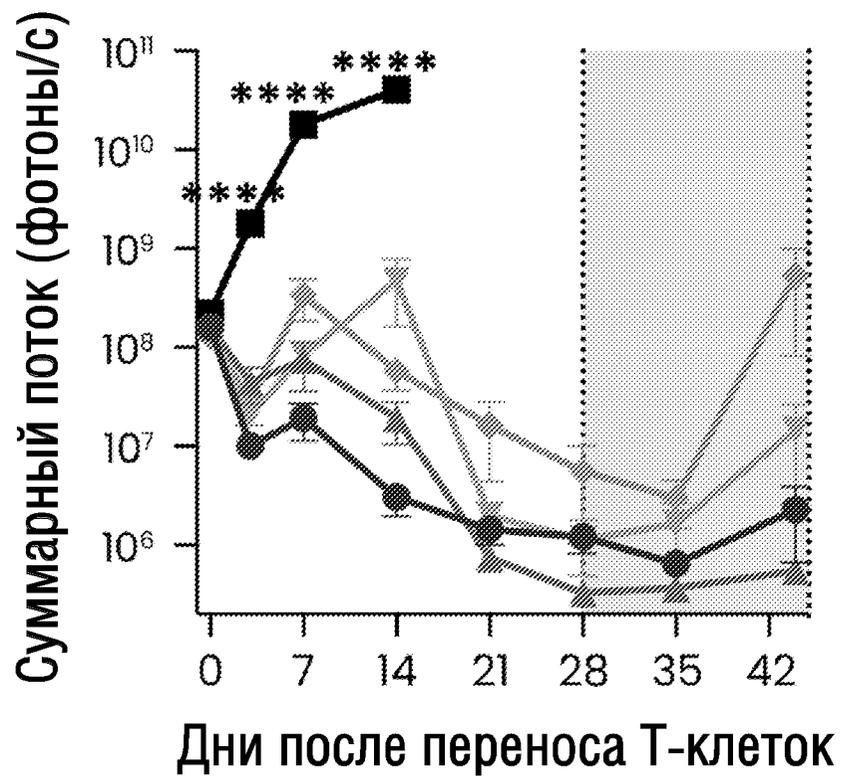


ID	a3D	6T1D	3F4N	4R8U	0C8S	5B1Q
Мутации	a3D	6T1D	6T1D (N50S)	6T1D (K48E, N50S)	6T1D (G8S, K48E, N50S, I59L)	6T1D (G8S,L21Q, K48E,N50S,I5 9L)
IL-2	na	6.511	1.299	0.600	0.278	0.269

ФИГ.13

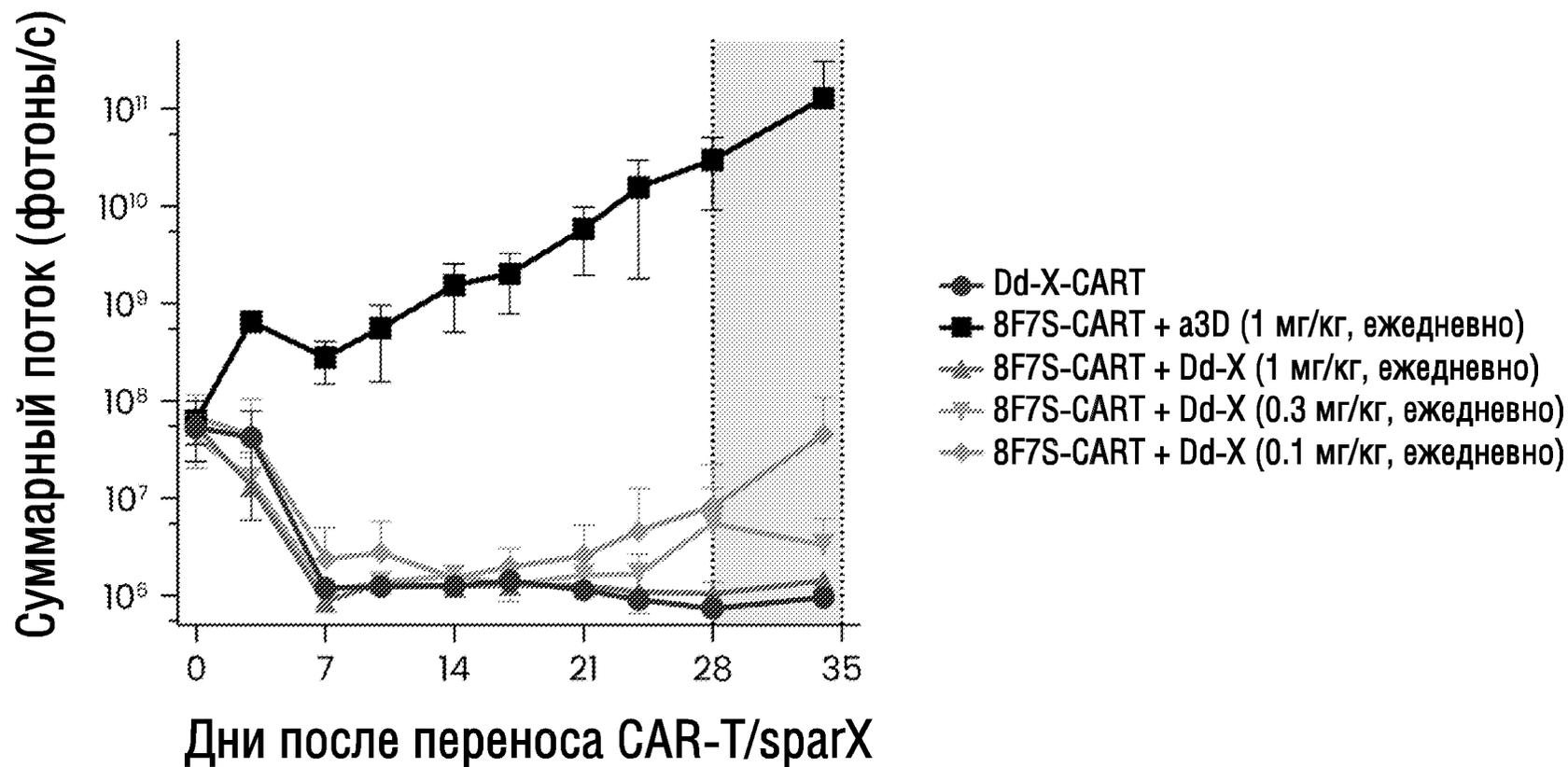


ФИГ.14



- Dd-X-CART
- 8F7S-CART + a3D (1 мг/кг, раз в два дня)
- ▨ 8F7S-CART + Dd-X (1 мг/кг, ежедневно)
- ▧ 8F7S-CART + Dd-X (1 мг/кг, раз в два дня)
- ◆ 8F7S-CART + Dd-X (0.3 мг/кг, раз в два дня)

ФИГ.15



ФИГ.16

Модель	Реципиентная линия	Данные пациента					Сведения о заболевании		
		Возраст	Пол	Этническая принадлежность	Диагноз	Анамнез лечения	Классификация FAB	Цитогенетика	Мутационный статус
2239	NOG	79	М	Афроамериканец	De novo	Не получал лечения	БДУ	Нормальная	IDH1/2 WT FLT3 N/A NPM мутант
2229	NCG	53	М	Европеец	Рефрактерный	Получал лечение	М1 (без созревания)	46XY, del(2)(p13P23), t(4;13)(q31;q34), add(4)(q25), del(6)(q13q25), t(9;22)(q34;q11.2), del(10)(q24), add(16)(q24) [20]	IDH1 мутант (R132C) FLT3 WT NPMWT
3438	NOG-EXL	62	Ж	Европеец	С рецидивом	Получал лечение	М4 (миело-моноцитарный)	Нормальная	IDH1/2 WT FLT3 WT NPMWT
2227	NOG	59	Ж	Европеец	С рецидивом	Получал лечение	М4 (миело-моноцитарный)	Нет данных	IDH1 мутант FLT3 ITD мутант NPM мутант
2240	NOG	75	М	нет данных	De novo	Не получал лечения	ОМЛ (аномалии 11q23)	46, XY, t(9;11)(p22;q23), add(10)(q24) [5]/46, XY[5]	IDH1/2 WT FLT3 WT NPM WT
2456	NOG	нет данных	Ж	Европеец	De novo	Получал лечение	БДУ	46, XX, del(7)(q22q36) [15]	IDH1/2 WT FLT3 WT NPM WT

ФИГ.17

