



(51) МПК
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C40B 40/08 (2006.01)
C40B 30/04 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 14/7051 (2020.08); *C07K 16/2833* (2020.08); *C12N 15/62* (2020.08); *C40B 40/08* (2020.08); *C40B 30/04* (2020.08); *A61K 35/17* (2020.08); *A61K 38/17* (2020.08); *A61K 39/39558* (2020.08); *A61P 35/00* (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2018118652, 21.10.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.10.2016Дата регистрации:
16.03.2022

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
 23.10.2015 US 62/245,944;
 07.03.2016 US 62/304,918;
 03.06.2016 US 62/345,649;
 01.08.2016 US 62/369,694

(43) Дата публикации заявки: 26.11.2019 Бюл. № 33

(45) Опубликовано: 16.03.2022 Бюл. № 8

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 23.05.2018(86) Заявка РСТ:
US 2016/058305 (21.10.2016)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2017/070608 (27.04.2017)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б.Спаская, 25, строение 3,
 ООО "Юридическая фирма Городисский и
 Партнеры"

(72) Автор(ы):

ЛУ Цзинвэй (US),
 ЯН Чжюань (US),
 ЛЮ Чэн (US),
 ЛЮ Хун (US),
 СЮЙ Иян (US),
 ЯНЬ Су (US),
 ЧАНЬ Вивьен Вай-фань (US),
 ХОРАН Лукас (US)

(73) Патентообладатель(и):

ЕУРЕКА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: EP0340793 A2, 08.11.1989. HARRIS
 D.T. et al., Adoptive T Cell Therapies: A
 Comparison of T Cell Receptors and Chimeric
 Antigen Receptors, Trends Pharmacol Sci. 2016,
 Vol. 37, No. 3, pp. 220-230. WU X. et al., Protein
 design of IgG/TCR chimeras for the co-expression
 of Fab-like moieties within bispecific antibodies,
 MAbs., 2015, Volume 7, Issue 2, (см. прод.)

(54) ХИМЕРНЫЕ КОНСТРУКЦИИ АНТИТЕЛО/Т-КЛЕТОЧНЫЙ РЕЦЕПТОР И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, в частности к химерной молекуле (abTCR) антитело-Т-клеточный рецептор (TCR), специфически связывающейся с антиген-мишенью, а также к композиции и комплексу, ее содержащим. Также представлены эффекторная

клетка, представляющая на своей поверхности указанную молекулу, а также эффекторная клетка, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую вышеуказанную химерную молекулу. Изобретение также относится к способу уничтожения клетки-мишени,

представляющей антиген-мишень, с помощью указанной химерной молекулы. Изобретение эффективно для лечения ассоциированного с

антигеном-мишенью заболевания у нуждающегося. 8 н. и 39 з.п. ф-лы, 46 ил., 8 табл., 10 пр.

(56) (продолжение):

pp. 364-376. ХАЙДУКОВ С.В. и др., МНОГОЦВЕТНЫЙ ЦИТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ. ИДЕНТИФИКАЦИЯ Т-КЛЕТОК И ИХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ПО ЭКСПРЕССИИ $\alpha\beta$ -TCR И $\gamma\delta$ -TCR, Медицинская иммунология, 2008, Том 10, Номер 2-3, стр. 115-124. OREN R. et al., Functional comparison of engineered T cells carrying a native TCR versus TCR-like antibody-based chimeric antigen receptors indicates affinity/avidity thresholds, J Immunol., 2014, Volume 193, Issue 11, pp. 5733-5743.

RU 2767209 C2

RU 2767209 C2



(51) Int. Cl.
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C40B 40/08 (2006.01)
C40B 30/04 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C07K 14/7051 (2020.08); *C07K 16/2833* (2020.08); *C12N 15/62* (2020.08); *C40B 40/08* (2020.08); *C40B 30/04* (2020.08); *A61K 35/17* (2020.08); *A61K 38/17* (2020.08); *A61K 39/39558* (2020.08); *A61P 35/00* (2020.08)

(21)(22) Application: 2018118652, 21.10.2016

(24) Effective date for property rights:
21.10.2016Registration date:
16.03.2022

Priority:

(30) Convention priority:
 23.10.2015 US 62/245,944;
 07.03.2016 US 62/304,918;
 03.06.2016 US 62/345,649;
 01.08.2016 US 62/369,694

(43) Application published: 26.11.2019 Bull. № 33

(45) Date of publication: 16.03.2022 Bull. № 8

(85) Commencement of national phase: 23.05.2018

(86) PCT application:
US 2016/058305 (21.10.2016)(87) PCT publication:
WO 2017/070608 (27.04.2017)

Mail address:

129090, Moskva, ul. B.Spaskaya, 25, stroenie 3,
 OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i
 Partnery"

(72) Inventor(s):

LU, Jingwei (US),
 YANG, Zhiyuan (US),
 LIU, Cheng (US),
 LIU, Hong (US),
 XU, Yiyang (US),
 YAN, Su (US),
 CHAN, Vivien Wai-fan (US),
 HORAN, Lucas (US)

(73) Proprietor(s):

EUREKA THERAPEUTICS, INC. (US)

(54) CHIMERIC ANTIBODY/T-CELL RECEPTOR STRUCTURES AND THEIR APPLICATIONS

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology, in particular to a chimeric molecule of antibody-T-cell receptor (TCR) (abTCR), specifically binding to a target antigen, as well as to a composition and a complex containing it. An effector cell representing the specified molecule on its surface, as

well as an effector cell containing nucleic acid encoding the above-mentioned chimeric molecule are also presented. The invention also relates to a method for destroying a target cell representing an antigen target using the specified chimeric molecule.

EFFECT: invention is effective for the treatment of a disease associated with an antigen target in a person

who needs it.

47 cl, 46 dwg, 8 tbl, 10 ex

R U 2 7 6 7 2 0 9 C 2

R U 2 7 6 7 2 0 9 C 2

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По настоящей патентной заявке испрашивается приоритет Предварительной патентной заявки США No. 62/245944, поданной 23 октября 2015 г., Предварительной патентной заявки США No. 62/304918, поданной 7 марта 2016 г., Предварительной патентной заявки США No. 62/345649, поданной 3 июня 2016 г., и Предварительной патентной заявки США No. 62/369694, поданной 1 августа 2016 г., полное содержание всех из которых, таким образом, приведено посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0002] Это изобретение относится к химерным конструкциям антитело/Т-клеточный рецептор и к их применениям, включая лечение и диагностику заболеваний.

ПОДАЧА СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ТЕКСТОВОМ ФАЙЛЕ ASCII

[0003] Содержание следующего поданного текстового файла ASCII приведено в настоящем описании посредством ссылки в полном объеме: машиночитаемая форма (CRF) списка последовательностей (наименование файла: 750042000340SEQLIST.txt, дата записи: 20 октября 2016 г., размер: 104 КВ).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ДЛЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Опосредованный Т-клетками иммунитет представляет собой адаптационный процесс развития специфических для антигена (Ag) Т-лимфоцитов для уничтожения вирусов, бактерий, паразитарных инфекций или злокачественных клеток. Он может включать также измененное узнавание собственного антигена, приводящее к аутоиммунным воспалительным заболеваниям. Специфичность Т-лимфоцитов к Ag основана на узнавании посредством Т-клеточного рецептора (TCR) уникальных антигенных пептидов, представленных посредством молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) Ag-представляющих клеток (APC) (Broere, et al., Principles of Immunopharmacology, 2011). Каждый Т-лимфоцит экспрессирует уникальный TCR на клеточной поверхности в результате селекции в ходе развития при созревании в тимусе. TCR существует в двух формах либо как гетеродимер $\alpha\beta$, либо как гетеродимер $\gamma\delta$. Т-клетки экспрессируют либо форму $\alpha\beta$, либо форму $\gamma\delta$ TCR на клеточной поверхности. Четыре цепи, $\alpha/\beta/\gamma/\delta$, все имеют характерную внеклеточную структуру, состоящую из высоко полиморфного подобного «вариабельной области иммуноглобулинов» N-концевого домена и подобного «константной области иммуноглобулинов» второго домена. Каждый из этих доменов имеет характерный внутридоменный дисульфидный мостик. Константная область является ближней к мембране клетки, за ней следуют соединительный пептид, трансмембранная область и короткий цитоплазматический хвост. Ковалентная связь между 2 цепями гетеродимерного TCR сформирована посредством остатка цистеина, локализованного внутри короткой соединительной пептидной последовательности, соединяющей мостиком внеклеточный константный домен и трансмембранную область, формирующего дисульфидную связь с остатком цистеина в парной цепи TCR в соответствующем положении (The T cell Receptor Factsbook, 2001).

[0005] TCR $\alpha\beta$ и $\gamma\delta$ ассоциированы с неполиморфными связанными с мембраной белками CD3 с формированием функционального октамерного комплекса TCR-CD3, состоящего из гетеродимера TCR и трех димерных сигнальных модулей, CD3 δ/ϵ , CD3 γ/ϵ и CD3 ζ/ζ или ζ/η . Способные к ионизации остатки в трансмембранном домене каждой субъединицы формируют взаимодействия, удерживающие комплекс вместе. Для активации Т-клетки, N-концевые вариабельные области TCR узнают комплекс пептид/МНС, представленный на поверхности клетки-мишени, в то время как белки CD3 участвуют в передаче сигнала (Call et al., Cell. 111(7):967-79, 2002; The T cell Receptor

Factsbook, 2001).

[0006] $\alpha\beta$ TCR, называемый также обычный TCR, экспрессируется на большинстве лимфоцитов и состоит из гликозилированных полиморфных цепей α и β . Различные $\alpha\beta$ TCR могут различать различные пептиды, погруженные в поверхности молекул МНС II (в основном экспрессированных на клеточных поверхностях APC) и МНС I (экспрессированных на всех ядросодержащих клетках), размеры и формы которых являются относительно постоянными. $\gamma\delta$ TCR, несмотря на то, что является сходным с $\alpha\beta$ TCR, узнает антигены, несущие углевод, нуклеотиды или фосфор, независимо от представления МНС образом (The T cell Receptor Factsbook, 2001; Girardi et al., *J. Invest. Dermatol.* 126(1):25-31, 2006; Hayes et al., *Immunity.* 16(6):827-38, 2002).

[0007] Белки клеточной поверхности составляют только небольшую фракцию клеточных белков, и большинство из этих белков не являются опухолеспецифическими. В отличие от этого, мутантные или онкогенные опухолеассоциированные белки, как правило, являются локализованными внутри клеток, ядерными, цитоплазматическими или секреторными. Большинство внутриклеточных белков экспонируются на клеточной поверхности в качестве части нормального процесса катаболизма белка и его представления посредством молекул МНС. Внутриклеточные белки обычно подвергаются деградации посредством протеасомы или эндо/лизосом, и полученные специфические пептидные фрагменты связываются с молекулами МНС класса I/II. Эти комплексы пептид/МНС экспонированы на клеточной поверхности, где они предоставляют мишени для узнавания Т-клетками посредством взаимодействия TCR с пептидом/МНС (Scheinberg et al., *Oncotarget.* 4(5):647-8, 2013; Cheever et al., *Clin. Cancer Res.* 15(17):5323-37, 2009).

[0008] В последние два десятилетия, фундаментальные успехи в иммунологии и биологии опухолей, в сочетании с идентификацией большого количества антигенов опухолей, привели к значительному прогрессу в области иммунотерапии на основе клеток. Т-клеточная терапия занимает большое место в области иммунотерапии на основе клеток, с целью лечения злокачественных опухолей посредством переноса аутологичных и подвергнутых размножению *ex vivo* Т-клеток пациентам, и приводила к некоторым заметным противоопухолевым ответам (Blattman et al., *Science.* 305(5681):200-5, 2004). Например, введение природных инфильтрующих опухоль лимфоцитов (TIL), подвергнутых размножению *ex vivo*, опосредовало частоту объективных ответов в диапазоне 50-70% у пациентов с меланомой, включая объемные инвазивные опухоли во множестве участков, затрагивающих печень, легкие, мягкие ткани и головной мозг (Rosenberg et al., *Nat. Rev. Cancer.* 8(4):299-308, 2008; Dudley ME et al., *J. Clin. Oncol.* 23(10):2346-57, 2005).

[0009] Главным ограничением широкого распространения применения терапии TIL является сложность получения Т-клеток человека с противоопухолевым потенциалом. В качестве альтернативного способа, экзогенные высоко аффинные TCR можно вводить в нормальные аутологичные Т-клетки пациентов посредством модификации Т-клеток. Показано, что адоптивный перенос этих клеток пациентам с истощением лимфоцитов опосредует регрессию злокачественных опухолей при таких злокачественных опухолях как меланома, колоректальная карцинома, и синовиальная саркома (Kunert R et al., *Front. Immunol.* 4:363, 2013). В недавних клинических исследованиях фазы I с использованием TCR против NY-ESO-1 против синовиальной саркомы опубликована общая частота ответа 66%, и полный ответ достигнут у одного из пациентов, подвергнутых Т-клеточной терапии (Robbins PF et al., *Clin. Cancer Res.* 21(5):1019-27, 2015).

[0010] Одним из преимуществ Т-клеточной терапии со сконструированным TCR является то, что он может быть нацелен на целый ряд потенциальных внутриклеточных опухолеспецифических белков, процессируемых и доставляемых к клеточной поверхности посредством представления МНС. Более того, TCR является высоко чувствительным и может быть активирован посредством только небольшого количества молекул антигенного пептида/МНС, что, в свою очередь, может запускать цитолитический ответ Т-клеток, включая секрецию цитокинов, пролиферацию Т-клеток и цитолиз определенных клеток-мишеней. Таким образом, по сравнению с антителами или низкомолекулярными лекарственными средствами, Т-клетки со сконструированным TCR являются особенно ценными из-за их способности уничтожать клетки-мишени с очень небольшим количеством внутриклеточных антигенов-мишеней (Kunert R et al., *Front. Immunol.* 4:363, 2013).

[0011] Однако, в отличие от терапевтических антител, по большей части открытых посредством технологий гибридомы или дисплея, идентификация специфических для мишени TCR требует получения специфических для пептида-мишени/МНС клонов TCR из Т-клеток пациента и скрининга по правильной комбинации цепей α - β , обладающей оптимальной аффинностью связывания антигена-мишени. Очень часто, фаговый/ дрожжевой дисплей используют после клонирования TCR из Т-клеток пациента для дополнительного увеличения аффинности связывания мишени TCR. Полный процесс требует квалификации во многих областях и требует большого количества времени (Kobayashi E et al., *Oncoimmunology.* 3(1):e27258, 2014). Сложности процесса открытия TCR в большой степени затрудняли широкое распространение применения Т-клеточной терапии со сконструированным TCR. Этому препятствовала также связанная с лечением токсичность, особенно для TCR против антигенов, сверхэкспрессированных на клетках опухолей, но экспрессированных также на здоровых клетках, или для TCR, узнающих комплексы нецелевой пептид/МНС (Rosenberg SA et al., *Science.* 348(6230):62-8, 2015).

[0012] Другой способ разработан в последние годы для привлечения Т-клеток для направленной иммунотерапии злокачественных опухолей. Этот новый способ называют Т-клеточной терапией с химерным рецептором антигена (CAR-T). Она объединяет тонкую специфичность нацеливания моноклональных антител с сильной цитотоксичностью и длительной персистенцией, обеспечиваемыми цитотоксическими Т-клетками. CAR состоит из внеклеточного домена, узнающего антиген клеточной поверхности, трансмембранной области и внутриклеточного передающего сигналы домена. Внеклеточный домен состоит из антигенсвязывающих переменных областей из тяжелой и легкой цепей моноклонального антитела, слитых в одноцепочечный переменный фрагмент (scFv). Внутриклеточный передающий сигналы домен содержит иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), такой как мотивы из CD3 ζ или FcR γ , и один или несколько костимулирующих передающих сигналы доменов, таких как домены из CD28, 4-1BB или OX40 (Barrett DM et al., *Annu. Rev. Med.* 65:333-47, 2014; Davila ML et al., *Oncoimmunology.* 1(9):1577-1583, 2012). Связывание антигенов-мишеней посредством CAR, привитых на поверхность Т-клеток, может запускать эффекторные функции Т-клеток независимо от взаимодействия комплекса TCR-пептид/МНС. Таким образом, Т-клетки, снабженные CAR, можно перенаправлять для атаки на широкое множество клеток, включая клетки, которые не соответствуют типу МНС для TCR на Т-клетках, но экспрессируют антигены поверхности клетки-мишени. Этот способ преодолевает ограничения рестрицированного по МНС узнавания TCR и исключает ускользание опухолей посредством нарушений представления антигена или экспрессии молекулы МНС. Клинические исследования показали клинически значимую

противоопухолевую активность терапии CAR-T при нейробластоме (Louis CU et al., Blood. 118(23):6050-6056, 2011), B-ALL (Maude, SL, et al., New England Journal of Medicine 371:16:1507-1517, 2014), CLL (Brentjens, RJ, et al. Blood 118:18:4817-4828, 2011) и В-клеточной лимфоме (Kochenderfer, JN, et al. Blood 116:20:4099-4102, 2010). В одном исследовании, опубликована 90% частота полной ремиссии у 30 пациентов с В-ALL, подвергнутых лечению с использованием терапии CD19-CAR T (Maude, SL, et al., выше).

[0013] Большинство, если не все, CAR, исследованные до настоящего времени, были нацелены на антигены опухолей с высокой экспрессией на клеточной поверхности. Для нацеливания на обладающие низким количеством копий антигены опухолей на клеточной поверхности и внутриклеточные антигены опухолей, представляющие собой 95% из всех известных опухолеспецифических антигенов, существует необходимость в более активных и более эффективно сконструированных видах клеточной терапии (Cheever, et al., Clin. Cancer Res. 15(17):5323-37, 2009).

[0014] Несколько попыток предпринимали для конструирования молекул химерного рецептора, обладающих специфичностью антитела с эффекторными функциями Т-клеточного рецептора. См., например, Kuwana, Y, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 149(3):960-968, 1987; Gross, G, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:10024-10028, 1989; Gross, G & Eshhar, Z, FASEB J. 6(15):3370-3378, 1992; Патент США No. 7741465. До настоящего времени, ни один из этих химерных рецепторов не одобрен для клинического применения, и необходимы новые виды дизайна для химерных рецепторов антитело-TCR с улучшенной экспрессией и функциональностью в Т-клетках человека.

[0015] Полное содержание описаний всех публикаций, патентов, патентных заявок и опубликованных патентных заявок, процитированных в настоящем описании, таким образом, приведено в настоящем описании посредством ссылки.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0016] Настоящая заявка в одном аспекте относится к конструкции (такой как выделенная конструкция), содержащей группу антитела (такую как подобный Fab антигенсвязывающий модуль), слитый с модулем Т-клеточного рецептора (указанную конструкцию также обозначают в настоящем описании как «химерная молекула антитело-TCR», или «abTCR»). В некоторых вариантах осуществления, abTCR содержит подобный Fab антигенсвязывающий модуль, специфически связывающий антиген-мишень, и модуль Т-клеточного рецептора (TCRM), способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR-передающий сигналы модуль. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой комплекс, содержащий пептид и белок МНС (такой как белок МНС класса I или белок МНС класса II). В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой антиген клеточной поверхности.

[0017] Некоторые варианты осуществления относятся к abTCR (такому как выделенный abTCR), специфически связывающему антиген-мишень, где abTCR содержит:
 а) первую полипептидную цепь, содержащую первый антигенсвязывающий домен, содержащий домены V_H и C_{H1} антитела, и первый домен Т-клеточного рецептора (TCRD) содержащий первый трансмембранный домен первой субъединицы TCR; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй антигенсвязывающий домен, содержащий домены V_L и C_L антитела и второй TCRD, содержащий второй трансмембранный домен второй субъединицы TCR, где домены V_H и C_{H1} первого антигенсвязывающего домена и домены V_L и C_L второго антигенсвязывающего домена формируют подобный Fab антигенсвязывающий модуль, специфически связывающий

антиген-мишень, и где первый TCRD и второй TCRD формируют модуль Т-клеточного рецептора (TCRM), способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR-передающий сигналы модуль. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством одной или
 5 нескольких дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль содержит дисульфидную связь между остатком в домене C_H1 в первой полипептидной цепи и остатком в домене C_L во второй полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый пептидный линкер между первым
 10 антигенсвязывающим доменом и первым TCRD. В некоторых вариантах осуществления, вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй пептидный линкер между вторым антигенсвязывающим доменом и вторым TCRD. В некоторых вариантах осуществления, первый пептидный линкер и/или второй пептидный линкер имеют длину, индивидуально, от приблизительно 5 до приблизительно 50 аминокислот. В некоторых
 15 вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой антиген клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности выбран из группы, состоящей из белка, углевода и липида. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой CD19, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D или FCRL5. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень
 20 представляет собой комплекс, содержащий пептид и белок главного комплекса гистосовместимости (MHC).

[0018] Некоторые варианты осуществления относятся к abTCR, специфически связывающему антиген-мишень, содержащему: а) первую полипептидную цепь, содержащую первый антигенсвязывающий домен, содержащий домен V_H антитела, и
 25 первый TCRD, содержащий первый трансмембранный домен первой субъединицы TCR; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй антигенсвязывающий домен, содержащий домены V_L антитела, и второй TCRD, содержащий второй трансмембранный домен второй субъединицы TCR, где домен V_H первого антигенсвязывающего домена
 30 и домен V_L второго антигенсвязывающего домена формируют антигенсвязывающий модуль, специфически связывающий антиген-мишень, где первый TCRD и второй TCRD формируют модуль Т-клеточного рецептора (TCRM), способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR-передающий сигналы модуль, и где антиген-мишень представляет собой комплекс, содержащий пептид и белок MHC. В некоторых вариантах
 35 осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый пептидный линкер между первым антигенсвязывающим доменом и первым TCRD, и вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй пептидный линкер между вторым антигенсвязывающим доменом и вторым TCRD. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры содержат, индивидуально, константный домен
 40 или его фрагмент из иммуноглобулина или субъединицы Т-клеточного рецептора. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры содержат, индивидуально, домен CH1, CH2, CH3, CH4 или CL антитела, или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры содержат, индивидуально, домен C_α, C_β, C_γ или C_δ TCR, или его фрагмент.

[0019] В некоторых вариантах осуществления, в соответствии с любым из abTCR (такими как выделенные abTCR), описанным выше, первый TCRD дополнительно содержит первый соединительный пептид или его фрагмент из субъединицы TCR с N-конца от первого трансмембранного домена, второй TCRD дополнительно содержит

второй соединительный пептид или его фрагмент из субъединицы TCR с N-конца от второго трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления, TCRM содержит дисульфидную связь между остатком в первом соединительном пептиде и остатком во втором соединительном пептиде. В некоторых вариантах осуществления, 5 первый TCRD дополнительно содержит первый внутриклеточный домен TCR, содержащий внутриклеточную последовательность TCR с C-конца от первого трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления, второй TCRD дополнительно содержит второй внутриклеточный домен TCR, содержащий внутриклеточную последовательность TCR с C-конца от второго трансмембранного 10 домена. В некоторых вариантах осуществления, abTCR связывает антиген-мишень с равновесной константой диссоциации (K_d) от приблизительно 0,1 пМ до приблизительно 500 нМ. В некоторых вариантах осуществления, ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль выбран из группы, состоящей из CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\gamma\epsilon$ и $\zeta\zeta$.

[0020] В некоторых вариантах осуществления, в соответствии с любым из abTCR 15 (таким как выделенные abTCR), описанным выше, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий костимулирующую внутриклеточную передающую сигналы последовательность с C-конца от первого трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления, вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй 20 вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий костимулирующую внутриклеточную передающую сигналы последовательность с C-конца от второго трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с N-конца от первого антигенсвязывающего домена. В некоторых вариантах осуществления, 25 вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с N-конца от второго антигенсвязывающего домена.

[0021] В некоторых вариантах осуществления, в соответствии с любым из abTCR (таким как выделенные abTCR), описанным выше, где антиген-мишень представляет собой комплекс, содержащий пептид и белок главного комплекса гистосовместимости 30 (МНС), пептид происходит из белка, выбранного из группы, состоящей из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1 и PSA.

[0022] В некоторых вариантах осуществления, в соответствии с любым из abTCR (таким как выделенные abTCR), описанным выше, а) первая субъединица TCR представляет собой цепь TCR α , и вторая субъединица TCR представляет собой цепь 35 TCR β ; б) первая субъединица TCR представляет собой цепь TCR β , и вторая субъединица TCR представляет собой цепь TCR α ; в) первая субъединица TCR представляет собой цепь TCR γ , и вторая субъединица TCR представляет собой цепь TCR δ ; или д) первая субъединица TCR представляет собой цепь TCR δ , и вторая субъединица TCR представляет собой цепь TCR γ .

[0023] В некоторых вариантах осуществления, в соответствии с любым из abTCR 40 (таким как выделенные abTCR), описанным выше, представлена нуклеиновая кислота, кодирующая первую и вторую полипептидные цепи abTCR.

[0024] Некоторые варианты осуществления, в соответствии с любым из abTCR (таким как выделенные abTCR), описанным выше, относятся к комплексу, содержащему abTCR 45 и по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль, выбранный из группы, состоящей из CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\gamma\epsilon$ и $\zeta\zeta$. В некоторых вариантах осуществления, комплекс представляет собой октамер, содержащий abTCR и CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\gamma\epsilon$ и $\zeta\zeta$.

[0025] Некоторые варианты осуществления, в соответствии с любым из abTCR (таким как выделенные abTCR), описанным выше, относятся к эффекторной клетке, представляющей на своей поверхности abTCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую abTCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка не экспрессирует первую субъединицу TCR и/или вторую субъединицу TCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, а) первая субъединица TCR представляет собой TCR γ , и вторая субъединица TCR представляет собой TCR δ ; или б) первая субъединица TCR представляет собой TCR δ , и вторая субъединица TCR представляет собой TCR γ ; и эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ T-клетку. В некоторых вариантах осуществления, а) первая субъединица TCR представляет собой TCR γ , и вторая субъединица TCR представляет собой TCR δ ; или б) первая субъединица TCR представляет собой TCR δ , и вторая субъединица TCR представляет собой TCR γ ; и эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ T-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторную клетку модифицируют для блокирования или уменьшения экспрессии первой субъединицы эндогенного TCR и/или второй субъединицы эндогенного TCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, первая субъединица TCR представляет собой TCR α , и вторая субъединица TCR представляет собой TCR β ; или б) первая субъединица TCR представляет собой TCR β , и вторая субъединица TCR представляет собой TCR α ; и эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ T-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии TCR α и/или TCR β . В некоторых вариантах осуществления, а) первая субъединица TCR представляет собой TCR γ , и вторая субъединица TCR представляет собой TCR δ ; или б) первая субъединица TCR представляет собой TCR δ , и вторая субъединица TCR представляет собой TCR γ ; и эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ T-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии TCR γ и/или TCR δ .

[0026] Некоторые варианты осуществления, в соответствии с любым из abTCR (таким как выделенные abTCR), описанным выше, относятся к эффекторной клетке, представляющей на своей поверхности abTCR, где эффекторная клетка представляет собой T-клетку. В некоторых вариантах осуществления, T-клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической T-клетки, T-клетки-помощника, T-клетки - естественного киллера и супрессорной T-клетки.

[0027] Некоторые варианты осуществления, в соответствии с любым из abTCR (таким как выделенные abTCR), описанным выше, относятся к эффекторной клетке, представляющей на своей поверхности abTCR, где эффекторная клетка содержит а) первый вектор, содержащий первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первую полипептидную цепь abTCR под контролем первого промотора, и б) второй вектор, содержащий вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вторую полипептидную цепь abTCR под контролем второго промотора.

[0028] Некоторые варианты осуществления, в соответствии с любым из abTCR (таким как выделенные abTCR), описанным выше, относятся к эффекторной клетке, представляющей на своей поверхности abTCR, где эффекторная клетка содержит вектор, содержащий а) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первую полипептидную цепь abTCR под контролем первого промотора; и б) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вторую полипептидную цепь abTCR под контролем второго промотора.

[0029] Некоторые варианты осуществления, в соответствии с любым из abTCR (таким как выделенные abTCR), описанным выше, относятся к эффекторной клетке,

представляющей на своей поверхности abTCR, где эффекторная клетка содержит вектор, содержащий а) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первую полипептидную цепь abTCR, и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вторую полипептидную цепь abTCR, где первая и вторая

5 последовательности нуклеиновой кислоты находятся под контролем одного промотора.

[0030] Некоторые варианты осуществления, в соответствии с любым из abTCR (таким как выделенные abTCR), описанным выше, относятся к эффекторной клетке, представляющей на своей поверхности abTCR, где экспрессия первой полипептидной цепи abTCR более, чем в два раза отличается от экспрессии второй полипептидной цепи abTCR.

10

[0031] Некоторые варианты осуществления относятся к способу уничтожения клетки-мишени, представляющей антиген-мишень, включающему приведение клетки-мишени в контакт с эффекторной клеткой, экспрессирующей abTCR в соответствии с любым из abTCR (таким как выделенные abTCR), описанным выше, где abTCR специфически связывает антиген-мишень.

15

[0032] Некоторые варианты осуществления, относятся к способу уничтожения клетки-мишени, представляющей антиген-мишень, включающему приведение клетки-мишени в контакт с эффекторной $\alpha\beta$ Т-клеткой, содержащей abTCR, специфически связывающий антиген-мишень, содержащий: а) первую полипептидную цепь, содержащую первый антигенсвязывающий домен, содержащий домен V_H антитела, и первый TCRD,

20

содержащий первый трансмембранный домен первой субъединицы TCR; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй антигенсвязывающий домен, содержащий домены V_L антитела, и второй TCRD, содержащий второй трансмембранный домен

25

второй субъединицы TCR, где домен V_H первого антигенсвязывающего домена и домен V_L второго антигенсвязывающего домена формируют антигенсвязывающий модуль,

30

специфически связывающий антиген-мишень, где первый TCRD и второй TCRD формируют модуль Т-клеточного рецептора (TCRM), способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR-передающий сигналы модуль, и где первая

35

субъединица TCR представляет собой TCR γ , и вторая субъединица TCR представляет собой TCR δ , или первая субъединица TCR представляет собой TCR δ , и вторая субъединица TCR представляет собой TCR γ . В некоторых вариантах осуществления,

40

первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый пептидный линкер между первым антигенсвязывающим доменом и первым TCRD, и вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй пептидный линкер между вторым антигенсвязывающим доменом и вторым TCRD. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры содержат, индивидуально, константный домен или его фрагмент

45

из иммуноглобулина или субъединицы Т-клеточного рецептора. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры содержат, индивидуально,

50

домен CH1, CH2, CH3, CH4 или CL антитела, или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры содержат, индивидуально,

55

домен C α , C β , C γ или C δ TCR, или его фрагмент.

[0033] В некоторых вариантах осуществления, в соответствии с любым из способов уничтожения клетки-мишени, описанным выше, контакт происходит *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления, контакт происходит *in vitro*.

60

[0034] Некоторые варианты осуществления относятся к фармацевтической композиции, содержащей abTCR в соответствии с любым из abTCR (таким как выделенные abTCR), описанным выше, и фармацевтически приемлемый носитель.

Некоторые варианты осуществления относятся к фармацевтической композиции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую абTCR в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанным выше, и фармацевтически приемлемый носитель. Некоторые варианты осуществления относятся к фармацевтической композиции, содержащей эффекторную клетку, экспрессирующую абTCR в соответствии с любым из абTCR (таким как выделенные абTCR), описанным выше, и фармацевтически приемлемый носитель.

[0035] Некоторые варианты осуществления относятся к способу лечения ассоциированного с антигеном-мишенью заболевания у нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей эффекторную клетку, экспрессирующую абTCR в соответствии с любым из абTCR (таким как выделенные абTCR), описанным выше.

[0036] Некоторые варианты осуществления относятся к способу лечения ассоциированного с антигеном-мишенью заболевания у нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей эффекторную $\alpha\beta$ T-клетку, содержащую абTCR, специфически связывающий антиген-мишень, содержащий: а) первую полипептидную цепь, содержащую первый антигенсвязывающий домен, содержащий домен V_H антитела, и первый TCRD, содержащий первый трансмембранный домен первой субъединицы TCR; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй антигенсвязывающий домен, содержащий домены V_L антитела, и второй TCRD, содержащий второй трансмембранный домен второй субъединицы TCR, где домен V_H первого антигенсвязывающего домена и домен V_L второго антигенсвязывающего домена формируют антигенсвязывающий модуль, специфически связывающий антиген-мишень, где первый TCRD и второй TCRD формируют модуль T-клеточного рецептора (TCRM), способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR-передающий сигналы модуль, и где первая субъединица TCR представляет собой TCR γ , и вторая субъединица TCR представляет собой TCR δ , или первая субъединица TCR представляет собой TCR δ , и вторая субъединица TCR представляет собой TCR γ . В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый пептидный линкер между первым антигенсвязывающим доменом и первым TCRD, и вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй пептидный линкер между вторым антигенсвязывающим доменом и вторым TCRD. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры содержат, индивидуально, константный домен или его фрагмент из иммуноглобулина или субъединицы T-клеточного рецептора. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры содержат, индивидуально, домен CH1, CH2, CH3, CH4 или CL антитела, или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры содержат, индивидуально, домен C α , C β , C γ , или C δ TCR или его фрагмент.

[0037] В некоторых вариантах осуществления, в соответствии с любым из способов лечения ассоциированного с антигеном-мишенью заболевания, описанным выше, ассоциированное с антигеном-мишенью заболевание представляет собой злокачественную опухоль. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из аденокарциномы, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака шейки матки, холангиокарциномы, видов колоректального рака, рака пищевода, глиобластомы, глиомы, печеночно-клеточной карциномы, рака головы и шеи, рака почки, лимфомы, лейкоза, рака легкого,

меланомы, мезотелиомы, множественной миеломы, рака поджелудочной железы, феохромоцитомы, плазмацитомы, нейробластомы, рака яичника, рака предстательной железы, саркомы, рака желудка, рака тела матки и рака щитовидной железы. В некоторых вариантах осуществления, ассоциированное с антигеном-мишенью заболевание представляет собой вирусную инфекцию. В некоторых вариантах осуществления, вирусная инфекция вызвана вирусом, выбранным из группы, состоящей из цитомегаловируса (CMV), вируса Эпштейна-Барр (EBV), вируса гепатита В (HBV), ассоциированного с саркомой Капоши вируса герпеса (KSHV), вируса папилломы человека (HPV), вируса контагиозного моллюска (MCV), вируса Т-клеточного лейкоза человека (HTLV-1), HIV (вируса иммунодефицита человека) и вируса гепатита С (HCV).

[0038] Некоторые варианты осуществления относятся к способу лечения ассоциированного с антигеном-мишенью заболевания у нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую abTCR в соответствии с любым из abTCR (таким как выделенные abTCR), описанным выше.

[0039] Некоторые варианты осуществления относятся к способу обогащения гетерогенной популяции клеток по эффекторной клетке, экспрессирующей abTCR в соответствии с любым из abTCR (таким как выделенные abTCR), описанным выше, где способ включает а) приведение гетерогенной популяции клеток в контакт с лигандом, содержащим антиген-мишень или один или несколько содержащихся в нем эпитопов, для формирования комплексов эффекторной клетки, связанной с лигандом; и б) отделение комплексов от гетерогенной популяции клеток, таким образом, получения популяции клеток, обогащенной эффекторной клеткой.

[0040] Некоторые варианты осуществления относятся к библиотеке нуклеиновых кислот, содержащей последовательности, кодирующие множество abTCR в соответствии с любым из abTCR (таким как выделенные abTCR), описанным выше.

[0041] Некоторые варианты осуществления относятся к способу скрининга библиотеки нуклеиновых кислот в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных выше, по последовательностям, кодирующим abTCR, специфические для антигена-мишени, включающему: а) введение библиотеки нуклеиновых кислот во множество клеток, так что abTCR экспрессируются на поверхности множества клеток; б) инкубацию множества клеток с лигандом, содержащим антиген-мишень или один или несколько содержащихся в нем эпитопов; в) сбор клеток, связанных с лигандом; и д) выделение последовательностей, кодирующих abTCR, из клеток, собранных на стадии с), таким образом, идентификации abTCR, специфических для антигена-мишени.

[0042] Изобретение относится также к способам получения любой из конструкций, описанных в настоящем описании, изделий, и наборов, пригодных для способов, описанных в настоящем описании.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0043] На ФИГ. 1А показано схематическое представление различных видов дизайна конструкции abTCR (abTCR-3, abTCR-4, abTCR-5 и abTCR-6).

[0044] На ФИГ. 1В показаны предусмотренные варианты видов дизайна конструкции abTCR.

[0045] На ФИГ. 2 показана общепринятая модель сборки комплекса TCR-CD3.

[0046] На ФИГ. 3 показан анализ Вестерн-блоттинга лизатов клеток J.RT3-T3.5 или Jurkat, индивидуально трансдуцированных конструкциями abTCR-3, -4, -5, -6 или -6MD, имеющими связывающую группу против AFP158/HLA*02:01, окрашенных с использованием антител против FLAG (происходящие из TCR α и TCR γ химерные

субъединицы) или антител против HA (происходящие из TCR β и TCR δ химерные
субъединицы).

[0047] На ФИГ. 4А показан анализ проточной цитометрии экспрессии CD3 ϵ на
поверхности клеток J.RT3-T3.5, индивидуально трансдуцированных конструкциями
5 abTCR-3, -4, -5, -6 или -6MD, имеющими связывающую группу против AFP158/HLA-
A*02:01; клетки окрашивали с использованием антитела против CD3 ϵ .

[0048] На ФИГ. 4В показан анализ проточной цитометрии связывания тетрамера
AFP158/HLA-A*02:01 на поверхности клеток J.RT3-T3.5, индивидуально
10 трансдуцированных конструкциями abTCR-3, -4, -5, -6 или -6MD, имеющими
связывающую группу против AFP158/HLA-A*02:01; клетки окрашивали с
использованием меченных фикоэритрином (PE) тетрамеров AFP158/HLA-A*02:01.

[0049] На ФИГ. 4С показан анализ проточной цитометрии связывания
антиидиотипического антитела на поверхности клеток J.RT3-T3.5, индивидуально
15 трансдуцированных конструкциями abTCR-3, -4, -5, -6 или -6MD, имеющими
связывающую группу против AFP158/HLA-A*02:01, узнаваемой антителом; клетки
окрашивали с использованием антиидиотипического антитела против связывающей
группы против AFP158/HLA-A*02:01 из конструкций abTCR.

[0050] На ФИГ. 5А показан анализ проточной цитометрии связывания антитела
против TCR α/β на поверхности клеток Jurkat, индивидуально трансдуцированных
20 конструкциями abTCR-3, -4, -5, -6 или -6MD, имеющими связывающую группу против
AFP158/HLA-A*02:01; клетки окрашивали с использованием антитела против TCR α/β .

[0051] На ФИГ. 5В показан анализ проточной цитометрии связывания тетрамера
AFP158/HLA-A*02:01 на поверхности клеток Jurkat, индивидуально трансдуцированных
25 конструкциями abTCR-3, -4, -5, -6 или -6MD, имеющими связывающую группу против
AFP158/HLA-A*02:01; клетки окрашивали с использованием меченных PE тетрамеров
AFP158/HLA-A*02:01.

[0052] На ФИГ. 5С показан анализ проточной цитометрии связывания
антиидиотипического антитела на поверхности клеток Jurkat, индивидуально
30 трансдуцированных конструкциями abTCR-3, -4, -5, -6 или -6MD, имеющими
связывающую группу против AFP158/HLA-A*02:01, узнаваемой антителом; клетки
окрашивали с использованием антиидиотипического антитела против связывающей
группы против AFP158/HLA-A*02:01 из конструкций abTCR.

[0053] На ФИГ. 6 показан анализ проточной цитометрии совместной экспрессии
CD3 ϵ с химерами abTCR в клетках J.RT3-T3.5, индивидуально трансдуцированных
35 конструкциями abTCR-6 или abTCR-6MD, имеющими связывающую группу против
AFP158/HLA-A*02:01; клетки совместно окрашивали с использованием антитела против
CD3 ϵ и тетрамеров AFP158/HLA-A*02:01.

[0054] На ФИГ. 7А показан анализ проточной цитометрии трансдуцированных abTCR
лимфоцитов периферической крови; клетки трансдуцировали конструкцией abTCR-6MD,
40 имеющей связывающую группу против AFP158/HLA-A*02:01 и совместно окрашивали
с использованием антитела против CD4, антитела против CD8 и тетрамеров AFP158/
HLA-A*02:01. Пунктирный прямоугольник показывает отбор тетрамер⁺ популяции
для клеток, показанных на графике CD4/CD8 на ФИГ. 7В.

[0055] На ФИГ. 7В показан анализ проточной цитометрии экспрессии CD4 и CD8 на
45 лимфоцитах периферической крови, подвергнутых либо ложной трансдукции, либо
трансдукции конструкцией abTCR-6MD, имеющей связывающую группу против AFP158/
HLA-A*02:01, и совместно окрашенных с использованием антител против CD4 и против
CD8; экспрессия CD4 и CD8 показана для клеток без отбора (верхние 2 панели) или для

клеток с отбором тетрамер⁺ (нижняя панель).

[0056] На ФИГ. 8 показан анализ Вестерн-блоттинга ассоциации экзогенных цепей abTCR с комплексом CD3; дигитониновые лизаты получали из первичных Т-клеток, подвергнутых либо ложной трансдукции, либо трансдукции с использованием abTCR-6MD, имеющей связывающую группу против AFP158/HLA-A*02:01; лизаты или иммунопреципитаты против FLAG подвергали блоттингу с использованием антител против FLAG, против CD3δ, против CD3ε, против CD3γ или против CD3ζ.

[0057] На ФИГ. 9А показана эффективность трансдукции в первичных Т-клетках после их трансдукции с использованием CAR или abTCR-6MD, где оба имеют одинаковые переменные домены связывающей группы против AFP158/HLA-A*02:01; клетки окрашивали с использованием меченных PE тетрамеров AFP158/HLA-A*02:01.

[0058] На ФИГ. 9В показано уничтожение линий злокачественных клеток HepG2, SK-HEP-1 и SK-HEP-1-AFP-MG, опосредованное Т-клетками, трансдуцированными конструкцией либо CAR, либо abTCR-6MD, где оба имеют одинаковые переменные домены связывающей группы против AFP158/HLA-A*02:01.

[0059] На ФИГ. 10 показан анализ проточной цитометрии дегрануляции трансдуцированных abTCR Т-клеток после совместного культивирования с клетками-мишенями; Т-клетки трансдуцировали с использованием либо CAR, либо abTCR-6MD, где оба имеют одинаковые переменные домены связывающей группы против AFP158/HLA-A*02:01. Показано окрашивание трансдуцированных клеток с использованием тетрамеров AFP158/HLA-A*02:01, антитела против CD8 или антитела против CD107a после совместного культивирования с клетками-мишенями HepG2, SK-HEP-1 и SK-HEP-1-AFP-MG.

[0060] На ФИГ. 11А показан уровень секреции панели цитокинов Т-клетками, подвергнутыми ложной трансдукции, или Т-клетками, трансдуцированными с использованием либо CAR, либо abTCR-6MD, где оба имеют одинаковые переменные домены связывающей группы против AFP158/HLA-A*02:01, после совместного культивирования с клетками HepG2.

[0061] На ФИГ. 11В показан уровень секреции панели цитокинов Т-клетками, подвергнутыми ложной трансдукции, или Т-клетками, трансдуцированными с использованием либо CAR, либо abTCR-6MD, где оба имеют одинаковые переменные домены связывающей группы против AFP158/HLA-A*02:01, совместно культивированными с клетками либо SK-HEP-1, либо SK-HEP-1-AFP-MG.

[0062] На ФИГ. 12А-12Н показан анализ проточной цитометрии трансдуцированных Т-клеток по продукции цитокинов в присутствии или в отсутствие злокачественных клеток-мишеней; Т-клетки трансдуцировали с использованием либо CAR, либо abTCR-6MD, где оба имеют одинаковые переменные домены связывающей группы против AFP158/HLA-A*02:01, совместно культивировали с клетками SK-HEP-1, SK-HEP-1-AFP-MG или HepG2; затем клетки совместно окрашивали с использованием меченных PE AFP158/HLA-A*02:01 тетрамеров, антитела против CD4 и одного из антител против TNF-α (12А и 12В), антитела против IFNγ (12С и 12D), антитела против IL-2 (12Е и 12F) или антитела против IL-6 (12G и 12H). Показанные популяции отобраны по тетрамер AFP158/HLA-A*02:01⁺ клеткам.

[0063] На ФИГ. 13 показана специфическая для мишени активация экспрессии цитокинов в CD4⁺ Т-клетках, трансдуцированных с использованием abTCR против AFP158 и инкубированных с линиями злокачественных клеток, положительными или отрицательными по экспрессии AFP.

[0064] На ФИГ. 14 показан анализ проточной цитометрии маркеров истощения Т-

клеток PD-1, LAG-3 и TIM-3 на Т-клетках, трансдуцированных CAR или abTCR, где оба имеют одинаковые вариабельные домены связывающей группы против AFP158/HLA-A*02:01, после воздействия положительных или отрицательных по антигену клеток-мишеней.

5 [0065] На ФИГ. 15 показан анализ проточной цитометрии маркеров дифференцировки Т-клеток CD28, CCR7 и гранзима В на Т-клетках, трансдуцированных CAR или abTCR, где оба имеют одинаковые вариабельные домены связывающей группы против AFP158/HLA-A*02:01, после воздействия положительных или отрицательных по антигену клеток-мишеней.

10 [0066] На ФИГ. 16А-16С показана характеристика Т-клеток, трансдуцированных либо abTCR-6MD против AFP158/HLA-A*02:01, либо abTCR-7 против AFP158/HLA-A*02:01, где оба имеют одинаковые вариабельные домены связывающей группы против AFP158/HLA-A*02:01. На ФИГ. 16А показан рост клеток для трансдуцированных Т-клеток. На ФИГ. 16В показан анализ Вестерн-блоттинга для экспрессии abTCR-6MD
15 и abTCR-7 в Т-клетках с использованием антитела против FLAG для детекции меченных FLAG конструкций. Окрашивание по CD3 ζ включено в качестве контроля нанесения. На ФИГ. 16С показано уничтожение клеток SK-HEP-1 и SK-HEP-1-AFP-MG, опосредованное Т-клетками, трансдуцированными с использованием либо abTCR-6MD, либо abTCR-7.

20 [0067] На ФИГ. 17 показано уничтожение линий злокачественных клеток JeKo-1, IM9, THP-1 и Jurkat, опосредованное Т-клетками, подвергнутыми ложной трансдукции, или Т-клетками, трансдуцированными с использованием либо CAR, либо abTCR-6MD, где оба имеют одинаковые вариабельные домены связывающей группы против CD19.

[0068] На ФИГ. 18А и 18В показан уровень секреции панели цитокинов Т-клетками,
25 подвергнутыми ложной трансдукции, или Т-клетками, трансдуцированными с использованием либо CAR, либо abTCR-6MD, где оба имеют одинаковые вариабельные домены связывающей группы против CD19, после совместного культивирования с линиями клеток JeKo-1, IM9, THP-1 или Jurkat.

[0069] На ФИГ. 19 показана специфическая для мишени активация экспрессии
30 цитокинов в CD4+ Т-клетках, трансдуцированных с использованием abTCR против CD19 и инкубированных с линиями злокачественных клеток, положительными или отрицательными по экспрессии CD19.

[0070] На ФИГ. 20 показан анализ проточной цитометрии маркеров дифференцировки
35 Т-клеток CD28, CCR7 и гранзима В на Т-клетках, трансдуцированных CAR или abTCR, где оба имеют одинаковые вариабельные домены связывающей группы против CD19, после воздействия положительных или отрицательных по антигену клеток-мишеней.

[0071] На ФИГ. 21 показана пролиферация CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток,
40 трансдуцированных CAR или abTCR, где оба химерных рецептора имеют одинаковые вариабельные домены связывающей группы против CD19, в ходе воздействия положительных по антигену клеток-мишеней, как оценено по разведению красителя от суток 2 до суток 3 после начала воздействия.

[0072] На ФИГ. 22 показана интернализация химерных рецепторов на
45 трансдуцированных CAR или abTCR Т-клетках, где оба химерных рецептора имеют одинаковые вариабельные домены связывающей группы против CD19, в указанных временных точках, как оценено по анализу проточной цитометрии клеток, окрашенных по поверхностным химерным рецепторам с использованием антиидиотипического антитела, нацеленного против группы, связывающей CD19.

[0073] На ФИГ. 23А и 23В показана характеристика Т-клеток, трансдуцированных

либо abTCR (против CD19 abTCR-6MD), либо cTCR (против CD19-cTCR), где оба имеют одинаковые вариабельные домены связывающей группы против CD19. На ФИГ. 23А показан рост клеток для Т-клеток с abTCR и cTCR. На ФИГ. 23В показано уничтожение положительной по CD19 линии злокачественных клеток Nalm-6, опосредованное
5 подвергнутыми ложной трансдукции Т-клетками или Т-клетками, трансдуцированными с использованием либо abTCR, либо cTCR.

[0074] На ФИГ. 24 показано уничтожение линий злокачественных клеток IM9, Colo205, MDA-231, MCF7, JeKo-1, Raji, Hep1 и Jurkat, опосредованное Т-клетками, подвергнутыми ложной трансдукции, или Т-клетками, трансдуцированными с использованием либо
10 CAR (#35 CAR), либо abTCR-6MD (#35 abTCR), где оба имеют одинаковые вариабельные домены связывающей группы против NY-ESO-1.

[0075] На ФИГ. 25А показан анализ проточной цитометрии экспрессии CD3 и CD56 на подгруппе НКТ-клеток, очищенных из PBMC человека.

[0076] На ФИГ. 25В показан уровень секреции цитокинов IL-2, GM-CSF, IFN γ и TNF α
15 Т-клетками, подвергнутыми ложной трансдукции, или Т-клетками, трансдуцированными с использованием abTCR-6MD, обладающих связывающей группой против CD19, совместно культивированными с линиями клеток Raji или Raji-CD19ko. Контроль включал только подвергнутые ложной трансдукции или трансдуцированные Т-клетки с abTCR, и только клетками Raji или Raji-CD19ko.

[0077] На ФИГ. 26А показан анализ проточной цитометрии экспрессии CD25 и CD4
20 на подгруппе клеток Т-рег, очищенных из PBMC человека.

[0078] На ФИГ. 26В показан уровень секреции цитокинов IL-2, GM-CSF, IFN γ и TNF α
Т-клетками, подвергнутыми ложной трансдукции, или Т-клетками, трансдуцированными с использованием abTCR-6MD, обладающих связывающей группой против CD19,
25 совместно культивированными с линиями клеток Raji или Raji-CD19ko.

[0079] На ФИГ. 27 показано уничтожение линий злокачественных клеток HepG2, SK-Hep1, и SK-Hep1-AFP MG, опосредованное подвергнутыми ложной трансдукции Т-клетками или Т-клетками, трансдуцированными с использованием abTCR, обладающих различными доменами CN1 иммуноглобулинов, где каждый обладает одинаковой
30 связывающей группой против AFP.

[0080] На ФИГ. 28 показано схематическое представление различных видов дизайна конструкции abTCR, содержащих один или несколько костимулирующих доменов (abTCR-6M-1, abTCR-6M-2, abTCR-6M-3, abTCR-6M-4, abTCR-6M-5, abTCR-6M-6, abTCR-6M-7, abTCR-6M-8).

[0081] На ФИГ. 29 показано уничтожение линий злокачественных клеток HepG2, SK-Hep1 и SK-Hep1-AFP MG, опосредованное подвергнутыми ложной трансдукции Т-клетками или Т-клетками, трансдуцированными с использованием различных abTCR, обладающих одним или несколькими С-концевыми костимулирующими доменами, где
35 каждый обладает одинаковой связывающей группой против AFP.

[0082] На ФИГ. 30 показан уровень секреции цитокинов IL-2, GM-CSF, IFN γ и TNF α
Т-клетками, подвергнутыми ложной трансдукции, или Т-клетками, трансдуцированными с использованием различных abTCR, обладающих одним или несколькими С-концевыми костимулирующими доменами, где каждый обладает одинаковой связывающей группой против AFP, совместно культивированными с линиями клеток SK-Hep1 или SK-Hep1-
40 AFP MG.

[0083] На ФИГ. 31 показано уничтожение линий злокачественных клеток Raji, Raji-CD19ko и JeKo-1, опосредованное подвергнутыми ложной трансдукции Т-клетками или Т-клетками, трансдуцированными с использованием различных abTCR, обладающих

одним или несколькими С-концевыми костимулирующими доменами, где каждый обладает одинаковой связывающей группой против CD19.

[0084] На ФИГ. 32 показан уровень секреции цитокинов IL-2, GM-CSF, IFN γ и TNF α Т-клетками, подвергнутыми ложной трансдукции, или Т-клетками, трансдуцированными с использованием различных abTCR, обладающих одним или несколькими С-концевыми костимулирующими доменами, где каждый обладает одинаковой связывающей группой против CD19, совместно культивированными с клетками Raji, Raji-CD19ko или JeKo-1.

[0085] На ФИГ. 33 показано изменение массы тела с течением времени в модели подкожного трансплантата SK-HEP-1-AFP-MG на мышцах, подвергнутых внутривенной инъекции либо подвергнутых ложной трансдукции Т-клеток, либо Т-клеток, трансдуцированных с использованием abTCR-6MD, обладающего связывающей группой против AFP158/HLA-A*02:01.

[0086] На ФИГ. 34А показан рост опухолей в подкожной модели SK-HEP-1-AFP-MG на мышцах, подвергнутых внутривенной инъекции либо подвергнутых ложной трансдукции Т-клеток, либо Т-клеток, трансдуцированных с использованием abTCR-6MD, обладающего связывающей группой против AFP158/HLA-A*02:01.

[0087] На ФИГ. 34В показан рост опухолей в подкожной модели SK-HEP-1-AFP-MG на мышцах без обработки или после однократной внутриопухолевой инъекции Т-клеток, трансдуцированных с использованием abTCR-6MD, обладающего связывающей группой против AFP158/HLA-A*02:01, когда средний объем опухоли достигал 300 мм³.

[0088] На ФИГ. 35 показан рост опухолей у мышей с репортерным внутривенным ксенотрансплантатом Raji после обработки Т-клетками, трансдуцированными с использованием различных abTCR против CD19 (клоны 5, 5-3, 5-9, и 5-14). Обработка подвергнутыми ложной трансдукции Т-клетками и отсутствие обработки Т-клетками включены в качестве контроля.

[0089] На ФИГ. 36 показан уровень в сыворотке IL-2, IFN- γ , TNF- α , и IL-10 у мышей с ксенотрансплантатом Raji, после инъекции подвергнутых ложной трансдукции Т-клеток или Т-клеток, трансдуцированных с использованием либо CAR, либо abTCR-6MD, где оба обладают переменными доменами связывающей группы против CD19 клона 5-13.

[0090] На ФИГ. 37 показана количественная оценка роста опухолей у мышей с репортерным ксенотрансплантатом Raji, после обработки Т-клетками, трансдуцированными с использованием либо CAR, либо abTCR-6MD, где оба обладают переменными доменами связывающей группы против CD19 клона 5-13. Подвергнутые ложной трансдукции Т-клетки включены в качестве контроля.

[0091] На ФИГ. 38 показаны результаты визуализации происходящей из опухоли биолюминесценции у мышей с репортерным ксенотрансплантатом Raji после обработки Т-клетками, трансдуцированными с использованием либо CAR, либо abTCR-6MD, где оба обладают переменными доменами связывающей группы против CD19 клона 5-13. Подвергнутые ложной трансдукции Т-клетки включены в качестве контроля. Переведенная в шкалу оттенков серого тепловая карта показывает общее количество фотонов в секунду в локализации опухолей, что выглядит как темные пятна, перекрывающие изображения мышей.

[0092] На ФИГ. 39 показана количественная оценка роста опухолей у мышей с репортерным ксенотрансплантатом Raji после повторного введения клеток опухолей через 7 недель после первоначальной имплантации клеток опухолей и обработки Т-клетками, трансдуцированными с использованием клона 5-13 abTCR-6MD против CD19. Подвергнутые ложной трансдукции Т-клетки включены в качестве контроля.

[0093] На ФИГ. 40 показан рост опухолей у мышей с репортерным внутривенным ксенотрансплантатом NALM-6 после обработки Т-клетками, трансдуцированными с использованием либо CAR, либо abTCR-6MD, где оба обладают вариабельными доменами связывающей группы против CD19 клона 5-13. Обработка подвергнутыми ложной трансдукции Т-клетками и отсутствие обработки Т-клетками включены в качестве контроля.

[0094] На ФИГ. 41 показан уровень в сыворотке IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ и TNF- α у мышей с ксенотрансплантатом NALM-6 после инъекции клеток, трансдуцированных с использованием либо CAR, либо abTCR-6MD, где оба обладают вариабельными доменами связывающей группы против CD19 клона 5-13. Обработка подвергнутыми ложной трансдукции Т-клетками и отсутствие обработки Т-клетками включены в качестве контроля.

[0095] На ФИГ. 42 показано количество положительных по химерному рецептору Т-клеток в крови от мышей с ксенотрансплантатом NALM-6 после инъекции клеток, трансдуцированных с использованием либо CAR, либо abTCR-6MD, где оба обладают вариабельными доменами связывающей группы против CD19 клона 5-13, на сутки 7 и 13 после обработки.

[0096] На ФИГ. 43 показан анализ проточной цитометрии для клеток опухолей в крови от мышей с ксенотрансплантатом NALM-6, подвергнутых инъекции клеток, трансдуцированных с использованием либо CAR, либо abTCR-6MD, где оба обладают вариабельными доменами связывающей группы против CD19 клона 5-13, на сутки 13 после обработки.

[0097] На ФИГ. 44 показан анализ проточной цитометрии для клеток опухолей в костном мозге от мышей с ксенотрансплантатом NALM-6, подвергнутых инъекции клеток, трансдуцированных с использованием либо CAR, либо abTCR-6MD, где оба обладают вариабельными доменами связывающей группы против CD19 клона 5-13, на сутки 13 после обработки.

[0098] На ФИГ. 45 показан анализ проточной цитометрии для экспрессии PD-1 на CD3⁺ Т-клетках, являющихся либо CD4⁺, либо CD8⁺, в крови от мышей с ксенотрансплантатом NALM-6, подвергнутых инъекции клеток, трансдуцированных с использованием либо CAR, либо abTCR-6MD, где оба обладают вариабельными доменами связывающей группы против CD19 клона 5-13.

[0099] На ФИГ. 46 показан анализ проточной цитометрии для экспрессии PD-1 на CD3⁺ Т-клетках, являющихся либо CD4⁺, либо CD8⁺ в костном мозге от мышей с ксенотрансплантатом NALM-6, подвергнутых инъекции клеток, трансдуцированных с использованием либо CAR, либо abTCR-6MD, где оба обладают вариабельными доменами связывающей группы против CD19 клона 5-13.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0100] Настоящая заявка относится к выделенной конструкции химерное антитело/Т-клеточный рецептор (обозначенной в настоящем описании как «abTCR»), которая содержит а) группу антитела, такую как фрагмент Fab или Fv, специфически связывающую антиген-мишень; и b) модуль Т-клеточного рецептора (TCRM), способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR-передающий сигналы модуль.

[0101] Авторы настоящего изобретения разработали серию новых и синтетических химерных конструкций антитело/TCR, объединяющих специфичность связывания и аффинность подобных TCR mAb авторов настоящего изобретения, так же как общепринятых mAb, со специфической для мишени цитотоксической активностью и контролируемой активацией, обеспечиваемыми посредством TCR. Для первичных Т-

клеток, трансдуцированных для экспрессии абTCR, показана эффективная экспрессия и формирование на поверхности стабильных подобных TCR передающих сигналы комплексов в ассоциации с эндогенными молекулами CD3. При введении посредством инженерии в Т-клетки, абTCR придают Т-клеткам сильную цитотоксичность против несущих мишень клеток опухолей как *in vitro*, так и *in vivo*, как в зависимой от МНС (пептид/антиген МНС), так и в не зависимой от МНС (антиген клеточной поверхности) конфигурациях. Специфическую для мишени активацию наблюдали для множества различных подгрупп Т-клеток, трансдуцированных для экспрессии абTCR, включая CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки, естественный киллер Т (NKT) клетки и регуляторный Т-клетки (T-reg). Кроме того, обнаружено, что абTCR, содержащие внутриклеточные костимулирующие последовательности, действуют так же хорошо, и в некоторых случаях, лучше, чем соответствующие абTCR без каких-либо костимулирующих последовательностей.

[0102] Несмотря на заметный лечебный потенциал, показанный для Т-клеточной терапии с использованием CAR, клинические исследования продолжают запускать серьезные неблагоприятные события, ассоциированные с избыточным высвобождением цитокинов и неконтролируемой пролиферацией Т-клеток. Без связи с теорией, считают, что абTCR можно регулировать посредством природного аппарата, контролирующего активацию TCR, который требует сборки с эндогенным комплексом CD3 для активации опосредованного Т-клетками уничтожения, и может, таким образом, избегать конститутивной активации. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что Т-клетки, трансдуцированные с использованием конструкций абTCR, экспрессируют более низкие уровни цитокинов (например, IL-2) и маркеров истощения Т-клеток (например, PD-1, TIM3 и LAG1), чем Т-клетки, трансдуцированные с использованием соответствующих химерных рецепторов антигенов (CAR), несущих такие же вариабельные области антитела, в то же время обладая эквивалентной активностью уничтожения злокачественных клеток. Этот способ, таким образом, обеспечивает значительное техническое преимущество над использованием CAR, приводя к получению Т-клеток, передача цитотоксических сигналов которых отвечает на эндогенные регуляторные механизмы Т-клеток, и которые обладают потенциалом дольше сохранять функциональность *in vivo*. Посредством комбинации исключительно оптимизированного связывания моноклональных антител со специфическими антигенами, такими как антигены клеточной поверхности или комплексы пептид/МНС, со способностью Т-клеточного рецептора привлекать эндогенные передающие сигналы комплексы для активации иммунцитов, изобретение обеспечивает высоко специфическое и активное нацеливание на обладающие низким количеством копий антигены клеточной поверхности, так же как внутриклеточные или секретированные антигены, посредством комплексов пептид/МНС.

[0103] Настоящая заявка, таким образом, относится к абTCR (такому как выделенный абTCR), содержащему группу антитела, специфически связывающую антиген-мишень, и TCRM, способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR-передающий сигналы модуль. абTCR может представлять собой гетеродимер, содержащий первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь. Группа антитела может содержать вариабельный домен тяжелой цепи антитела (V_H) и вариабельный домен легкой цепи антитела (V_L). В некоторых вариантах осуществления, группа антитела дополнительно содержит один или несколько константных доменов тяжелой цепи антитела, таких как константный домен 1 тяжелой цепи антитела (C_{H1})

и/или константный домен легкой цепи антитела (C_L). TCRM содержит первый домен Т-клеточного рецептора (TCRD), содержащий трансмембранный домен первой субъединицы TCR, и второй TCRD, содержащий трансмембранный домен второй субъединицы TCR. Первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь abTCR могут быть связаны посредством одной или нескольких дисульфидных связей. См. на ФИГ. 1А иллюстративные виды дизайна конструкции abTCR.

[0104] В другом аспекте изобретение относится к одной или нескольким нуклеиновым кислотам, кодирующим abTCR.

[0105] В другом аспекте, изобретение относится к комплексу (обозначенному в настоящем описании как «комплекс abTCR-CD3»), содержащему abTCR и по меньшей мере один ассоциированный с TCR-передающий сигналы модуль. Комплекс может представлять собой октамер, содержащий четыре димера abTCR, CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\gamma\epsilon$ и $\zeta\zeta$. Представлена также эффекторная клетка, такая как Т-клетка, экспрессирующая abTCR или комплекс abTCR-CD3, или ассоциированная с ними.

[0106] В другом аспекте, изобретение относится к композиции, содержащей abTCR. Композиция может представлять собой фармацевтическую композицию, содержащую abTCR или эффекторную клетку, экспрессирующую abTCR или ассоциированную с ним (например, Т-клетку, экспрессирующую abTCR).

[0107] Изобретение относится также к способам получения и применения abTCR (или клеток, экспрессирующих abTCR или ассоциированных с ним) для целей лечения, так же как к наборам и изделиям, которые можно использовать для таких способов. Кроме того, изобретение относится к способам лечения заболевания с использованием abTCR (или клеток, экспрессирующих abTCR или ассоциированных с ним).

Определения

[0108] В рамках изобретения, «лечение» или «обработка» представляет собой способ получения преимущественных или желательных результатов, включая клинические результаты. Для целей по этому изобретению, преимущественные или желательные клинические результаты включают, но без ограничения, одно или несколько из следующего: облегчение одного или нескольких симптомов, возникающих в результате заболевания, уменьшение степени заболевания, стабилизация заболевания (например, предотвращение или задержка ухудшения заболевания), предотвращение или задержка распространения (например, метастазирования) заболевания, предотвращение или задержка рецидива заболевания, задержка или замедление прогрессирования заболевания, облегчение состояния заболевания, обеспечение ремиссии (частичной или полной) заболевания, уменьшение дозы одного или нескольких других лекарственных средств, необходимых для лечения заболевания, задержка прогрессирования заболевания, увеличение или улучшение качества жизни, увеличение набора массы и/или продление выживаемости. Также включено в «лечение» уменьшение патологических последствий заболевания (например, таких как объем опухоли при раке). Способы по изобретению включают один или несколько из этих аспектов лечения.

[0109] Термины «обострение», «рецидив» или «рецидивирующий» относятся к возвращению злокачественной опухоли или заболевания после клинической оценки исчезновения заболевания. Диагноз отдаленного метастазирования или местного рецидива можно рассматривать как рецидив.

[0110] Термин «невосприимчивый» или «устойчивый» относится к злокачественной опухоли или заболеванию, не отвечающим на лечение.

[0111] «Активация», в рамках изобретения применительно к Т-клеткам, относится к состоянию Т-клетки, которая была успешно стимулирована для индукции поддающейся

детекции пролиферации клеток. Активация может также являться ассоциированной с индуцированной продукцией цитокинов и поддающимися детекции эффекторными функциями.

[0112] Термин «антитело» или «группа антитела» включает полноразмерные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты. Полноразмерное антитело содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи. Вариабельные области легкой и тяжелой цепей являются ответственными за связывание антигена. Вариабельная область в обеих цепях, как правило, содержит три высоко вариабельных петли, называемые определяющими комплементарность областями (CDR) (CDR легкой цепи (LC), включающими LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3, CDR тяжелой цепи (HC), включающими HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3). Границы CDR для антител и антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем описании, можно определять или идентифицировать в соответствии с Kabat, Chothia или Al-Lazikani (Al-Lazikani 1997; Chothia 1985; Chothia 1987; Chothia 1989; Kabat 1987; Kabat 1991). Три CDR тяжелых или легких цепей расположены между фланкирующими участками, известными как каркасные области (FR), которые являются более высоко консервативными, чем CDR, и формируют остов для поддержки гипервариабельных петель. Константные области тяжелых и легких цепей не вовлечены в связывание антигена, но обладают различными эффекторными функциями. Антитела отнесены к классам на основании аминокислотной последовательности константной области их тяжелых цепей. Пять главных классов или изотипов антител представляют собой IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, характеризующиеся присутствием тяжелых цепей α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Несколько из главных классов антител разделены на подклассы, такие как IgG1 (тяжелая цепь γ 1), IgG2 (тяжелая цепь γ 2), IgG3 (тяжелая цепь γ 3), IgG4 (тяжелая цепь γ 4), IgA1 (тяжелая цепь α 1) или IgA2 (тяжелая цепь α 2).

[0113] Термин «антигенсвязывающий фрагмент», в рамках изобретения, относится к фрагменту антитела, включая, например, диатело, Fab, Fab', F(ab')₂, фрагмент Fv, стабилизированный дисульфидными связями фрагмент Fv (dsFv), (dsFv)₂, биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), стабилизированное дисульфидными связями диатело (ds диатело), одноцепочечную молекулу антитела (scFv), димер scFv (двухвалентное диатело), мультиспецифическое антитело, сформированное из части антитела, содержащей одну или несколько CDR, однодоменное антитело верблюжьих, нанотело, доменное антитело, двухвалентное доменное антитело, или любой другой фрагмент антитела, который связывается с антигеном, но не содержит полную структуру антитела. Антигенсвязывающий фрагмент является способным связывать тот же самый антиген, с которым связывается исходное антитело или исходный фрагмент антитела (например, исходный scFv). В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий фрагмент может содержать одну или несколько CDR из конкретного человеческого антитела, привитые в каркасную область из одного или нескольких других человеческих антител.

[0114] «Подобный Fab антигенсвязывающий модуль» относится к группе антитела, содержащей первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, где первая и вторая полипептидные цепи содержат домен V_L антитела, домен C_L антитела, домен V_H антитела и домен C_H1 антитела. Домены V_L и C_L антитела могут находиться на одной цепи, с доменами V_H и C_H1 антитела на другой цепи, или домены V_L и C_H1 антитела могут находиться на одной цепи, с доменами V_H и C_L антитела на другой цепи. В некоторых вариантах осуществления, первая и вторая полипептидные цепи связаны посредством дисульфидной связи.

[0115] В рамках изобретения, первая группа антитела «конкурирует» за связывание

с антигеном-мишенью с второй группой антитела, когда первая группа антитела ингибирует связывание с антигеном-мишенью второй группы антитела по меньшей мере приблизительно на 50% (например, по меньшей мере приблизительно на любую величину из 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) в присутствии эквимолярной концентрации первой группы антитела, или наоборот.

Высокопроизводительный способ «сортировки» антител на основе их перекрестной конкуренции описан в Публикации РСТ No. WO 03/48731.

[0116] В рамках изобретения, термин «специфически связывается» или «является специфическим для» относится к поддающимся измерению и воспроизводимым взаимодействиям, таким как связывание между мишенью и антителом или группой антитела, определяющим присутствие мишени в присутствии гетерогенной популяции молекул, включая биологические молекулы. Например, группа антитела, которая специфически связывается с мишенью (которая может представлять собой эпитоп), представляет собой группу антитела, которая связывается с мишенью с большей аффинностью, авидностью, большей скоростью и/или с большей продолжительностью, чем она связывается с другими мишенями. В некоторых вариантах осуществления, группа антитела, которая специфически связывается с антигеном, вступает в реакцию с одной или несколькими антигенными детерминантами антигена (например, антигена клеточной поверхности или комплекса пептид/белок МНС) с аффинностью связывания, по меньшей мере приблизительно в 10 раз превышающей ее аффинность связывания для других мишеней.

[0117] Термин «Т-клеточный рецептор», или «TCR», относится к гетеродимерному рецептору, состоящему из цепей $\alpha\beta$ или $\gamma\delta$, которые образуют пары на поверхности Т-клетки. Каждая из цепей α , β , γ и δ состоит из двух Ig-подобных доменов: варибельного домена (V), обеспечивающего узнавание антигена посредством определяющих комплементарность областей (CDR), за которым следует константный домен (C), заякоренный в мембране клетки посредством соединительного пептида, и трансмембранной (ТМ) области. Область ТМ ассоциирована с инвариантными субъединицами передающего сигналы аппарата CD3. Каждый из доменов V обладает тремя CDR. Эти CDR взаимодействует с комплексом между антигенным пептидом, связанным с белком, кодированным главным комплексом гистосовместимости (пМНС) (Davis and Bjorkman (1988) Nature, 334, 395-402; Davis et al. (1998) Annu Rev Immunol, 16, 523-544; Murphy (2012), xix, 868 p.).

[0118] Термин «ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль» относится к молекуле, обладающей цитоплазматическим иммунорецепторным тирозиновым активирующим мотивом (ITAM), который является частью комплекса TCR-CD3. Ассоциированные с TCR передающие сигналы модули включают CD3 $\zeta\eta$, CD3 $\delta\epsilon$ и $\zeta\zeta$.

[0119] Термин «модуль» применительно к белку или части белка обозначает белок или часть белка, содержащую множество полипептидных цепей (например, димерный белок или часть димерного белка). Множество полипептидных цепей могут являться связанными, например, посредством линкера (например, пептидного линкера) или химической связи (например, пептидной связи). «Модуль» понимают как включающий структурно и/или функционально связанные части одного или нескольких полипептидов, которые составляют белок. Например, трансмембранный модуль димерного рецептора может относиться к частям каждой полипептидной цепи рецептора, которые пересекают мембрану. Модуль может также относиться к связанным частям одной полипептидной цепи. Например, трансмембранный модуль мономерного рецептора может относиться к частям одной полипептидной цепи рецептора, которые пронизывают мембрану.

[0120] Термин «модуль Т-клеточного рецептора», или «TCRM», относится к гетеродимеру, содержащему последовательности, происходящие из Т-клеточного рецептора. TCRM содержит трансмембранные домены Т-клеточного рецептора, и может дополнительно содержать все или часть соединительных пептидов и/или

5 внутриклеточных доменов Т-клеточного рецептора.

[0121] «Выделенная» конструкция (такая как abTCR), в рамках изобретения, относится к конструкции, которая (1) не является ассоциированной с белками, обнаруженными в природе, (2) является свободной от других белков из того же источника, (3) экспрессируется в клетке из другого вида или (4) не встречается в природе.

10 [0122] Термин «выделенная нуклеиновая кислота», в рамках изобретения, предназначена для обозначения нуклеиновой кислоты из геномного источника, кДНК или синтетического источника или некоторых их комбинаций, которая, в соответствии с источником «выделенной нуклеиновой кислоты» (1) не является ассоциированной с

15 всем или частью полинуклеотида, в котором «выделенная нуклеиновая кислота» обнаружена в природе, (2) является функционально связанной с полинуклеотидом, с которым она не связана в природе, или (3) не встречается в природе в качестве части более длинной последовательности.

[0123] В рамках изобретения, термин «CDR» или «определяющая комплементарность область», предназначен для обозначения не являющихся непрерывными участков

20 связывания антигена, обнаруженных в вариабельной области полипептидов как тяжелой, так и легкой цепи. Эти конкретные области описаны в Kabat et al., J. Biol. Chem. 252: 6609-6616 (1977); Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, «Sequences of proteins of immunological interest» (1991); в Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); и в MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), где определения включают перекрывание

25 или подгруппы аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Тем не менее, применение любого определения для обозначения CDR антитела или привитых антител, или их вариантов предназначено для включения в объем термина, как определяют и применяют в настоящем описании. Аминокислотные остатки, включающие CDR, как определено в каждой из процитированных выше ссылок, приведены ниже в таблице 1

30 в качестве сравнения.

ТАБЛИЦА 1: ОПРЕДЕЛЕНИЯ CDR

	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³
V _H CDR1	31-35	26-32	30-35
35 V _H CDR2	50-65	53-55	47-58
V _H CDR3	95-102	96-101	93-101
V _L CDR1	24-34	26-32	30-36
V _L CDR2	50-56	50-52	46-55
V _L CDR3	89-97	91-96	89-96

40 ¹Нумерация остатков следует номенклатуре Kabat et al., выше

²Нумерация остатков следует номенклатуре Chothia et al., выше

³Нумерация остатков следует номенклатуре MacCallum et al., выше

45 [0124] Термин «химерные антитела» относятся к антителам, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи является идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям в антителах, полученных из конкретного вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антитела, в то время как остаток цепи(цепей) является идентичным или гомологичным соответствующим последовательностям в

антителах, полученных из другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антитела, так же как к фрагментам таких антител, при условии, что они обладают биологической активностью по этому изобретению (см. Патент США No. 4816567; и Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)).

5 [0125] Термин «полусинтетический» применительно к антителу или группе антитела означает, что антитело или группа антитела обладает одной или несколькими природными последовательностями и одной или несколькими неприродными (т.е., синтетическими) последовательностями.

[0126] Термин «полностью синтетический» применительно к антителу или группе антитела означает, что антитело или группа антитела обладает фиксированными, в основном или полностью природными парами каркасных областей V_H/V_L , но неприродными (т.е., синтетическими) последовательностями всех 6 CDR как тяжелых, так и легких цепей. Неприродные CDR включают CDR, содержащие модифицированные последовательности CDR человека, такие как последовательности CDR, модифицированные посредством консервативных аминокислотных замен или введенных остатков цистеина.

[0127] «Гуманизированные» формы не относящихся к человеку антител (например, грызунов) представляют собой химерные антитела, содержащие минимальную последовательность, происходящую из не относящегося к человеку антитела. По большей части, гуманизированные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины (реципиентное антитело), в которых остатки из гипервариабельной области (HVR) реципиента заменены на остатки из гипервариабельной области не относящихся к человеку видов (донорного антитела), таких как мышь, крыса, кролик или не относящийся к человеку примат, обладающие желательной специфичностью, аффинностью и емкостью. В некоторых случаях, остатки каркасной области (FR) человеческого иммуноглобулина заменены на соответствующие не относящиеся к человеку остатки. Более того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, не обнаруженные в реципиентном антителе или в донорном антителе. Эти модификации выполняют для дополнительного уточнения активности антитела. Как правило, гуманизированное антитело содержит в основном все из по меньшей мере одного, и как правило, двух, вариабельных доменов, в которых все или в основном все из гипервариабельных петель соответствуют петлям из не относящегося к человеку иммуноглобулина, и все или в основном все из FR представляют собой FR из последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело, необязательно, также может содержать по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило, константной области из человеческого иммуноглобулина. Более подробно, см. в Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); и Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992).

[0128] «Гомология» относится к сходству последовательности или идентичности последовательности между двумя полипептидами или между двумя молекулами нуклеиновой кислоты. Когда положение в обеих из двух сравниваемых последовательностях занято одинаковой мономерной субъединицей основания или аминокислоты, например, если положение в каждой из двух молекул ДНК занято аденином, тогда молекулы являются «гомологичными» в этом положении. «Процент гомологии» или «процентная идентичность последовательностей» между двумя последовательностями является функцией от количества совпадающих или гомологичных положений, общих для двух последовательностями, деленного на количество сравненных положений, умноженного на 100, рассматривая любые

консервативные замены как часть идентичности последовательности. Например, если 6 из 10 положений в двух последовательностях являются совпадающими или гомологичными, тогда две последовательности являются на 60% гомологичными. В качестве примера, последовательности ДНК АТТГСС и ТАТГГС разделяют 50% гомологии. Как правило, сравнение проводят, когда две последовательности выровнены для получения максимальной гомологии. Выравнивание для целей определения процента идентичности аминокислотных последовательностей можно осуществлять различными способами, находящимися в компетенции специалиста в данной области, например, с использованием публично доступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN, Megalign (DNASTAR) или MUSCLE. Специалист в данной области может определить подходящие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания на протяжении полной длины сравниваемых последовательностей. Для целей в настоящем описании, однако, значения % идентичности аминокислотных последовательностей получены с использованием компьютерной программы MUSCLE для сравнения последовательностей (Edgar, R.C., Nucleic Acids Research 32(5):1792-1797, 2004; Edgar, R.C., BMC Bioinformatics 5(1):113, 2004).

[0129] «Домен C_{H1}» IgG человека (также обозначенный как «C1» из домена «H1») обычно простирается от приблизительно аминокислоты 118 до приблизительно аминокислоты 215 (система нумерации EU).

[0130] Если не указано иное, «нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность», включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными вариантами друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Фраза нуклеотидная последовательность, кодирующая белок или РНК, может также включать интроны до такой степени, что нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, может, в некоторых вариантах, содержать интрон(ы).

[0131] Термин «функционально связанный» относится к функциональной связи между регуляторной последовательностью и гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, приводящей к экспрессии последней. Например, первая последовательность нуклеиновой кислоты является функционально связанной с второй последовательностью нуклеиновой кислоты, когда первую последовательность нуклеиновой кислоты вводят в функциональное взаимодействие с второй последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор является функционально связанным с кодирующей последовательностью, если промотор влияет на транскрипцию или экспрессию кодирующей последовательности. Как правило, функционально связанные последовательности ДНК являются непрерывными и, при необходимости соединения двух кодирующих белок областей, находятся в одной и той же рамке считывания.

[0132] Термин «индуцируемый промотор» относится к промотору, активность которого можно регулировать посредством добавления или удаления одного или нескольких специфических сигналов. Например, индуцируемый промотор может активировать транскрипцию функционально связанной нуклеиновой кислоты при специфическом наборе условий, например, в присутствии индуцирующего средства, которое активирует промотор и/или снимает репрессию промотора.

[0133] «Эффективное количество» абTCR или композиции, содержащей абTCR, как описано в настоящем описании, представляет собой количество, достаточное для

выполнения конкретно указанной цели. «Эффективное количество» можно определять эмпирически и посредством известных способов, относящихся к указанной цели.

[0134] Термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству абTCR или композиции, содержащей абTCR, как описано в настоящем описании, эффективному для «лечения» заболевания или нарушения у индивидуума. В случае злокачественной опухоли, терапевтически эффективное количество абTCR или композиции, содержащей абTCR, как описано в настоящем описании, может уменьшать количество злокачественных клеток; уменьшать размер или массу опухоли; ингибировать (т.е., замедлять до некоторой степени и предпочтительно, останавливать) инфильтрацию злокачественных клеток в периферические органы; ингибировать (т.е., замедлять до некоторой степени и предпочтительно, останавливать) метастазирование опухоли; ингибировать, до некоторой степени, рост опухоли; и/или облегчать, до некоторой степени, один или несколько симптомов, ассоциированных с злокачественной опухолью. В той мере, насколько абTCR или композиция, содержащая абTCR, как описано в настоящем описании, могут предотвращать рост и/или вызывать уничтожение существующих злокачественных клеток, они могут являться цитостатическими и/или цитотоксическими. В некоторых вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество представляет собой ингибирующее рост количество. В некоторых вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество представляет собой количество, улучшающее выживаемость без прогрессирования пациента. В случае инфекционного заболевания, такого как вирусная инфекция, терапевтически эффективное количество абTCR или композиции, содержащей абTCR, как описано в настоящем описании, может уменьшать количество клеток, инфицированных патогеном; уменьшать продукцию или высвобождение происходящих из патогена антигенов; ингибировать (т.е., замедлять до некоторой степени и предпочтительно, останавливать) распространение патогена к неинфицированным клеткам; и/или облегчать, до некоторой степени, один или несколько симптомов, ассоциированных с инфекцией. В некоторых вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество представляет собой количество, продлевающее выживаемость пациента.

[0135] В рамках изобретения, под «фармацевтически приемлемый» или «фармакологически совместимый» понимают материал, который не является биологически или иным образом нежелательным, например, материал можно включать в фармацевтическую композицию, вводимую пациенту, без вызова значительных нежелательных биологических эффектов или взаимодействия опасным образом с другими компонентами композиции, в которой он содержится. Фармацевтически приемлемые носители или наполнители предпочтительно соответствуют необходимым стандартам токсикологического и производственного тестирования и/или включены в Справочник по неактивным компонентам, подготовленный Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США.

[0136] Понятно, что варианты осуществления по изобретению, описанные в настоящем описании, включают «состоящие» и/или «в основном состоящие из» вариантов осуществления.

[0137] Ссылка на «приблизительное» значение или параметр в настоящем описании включает (и описывает) варианты, относящиеся к этому значению или параметру по существу. Например, описание, относящееся к «приблизительно X», включает описание «X».

[0138] В рамках изобретения, ссылка на «отсутствие» значения или параметра, как правило, обозначает и описывает «отличный от» значения или параметра. Например,

то, что способ не используют для лечения злокачественной опухоли типа X, означает, что способ используют для лечения злокачественных опухолей типов, отличных от X.

[0139] В рамках изобретения и в прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа и «или» включают объекты ссылки множественного числа, если контекст явно не требует иного.

Химерные конструкции антитело/Т-клеточный рецептор

[0140] В одном аспекте настоящее изобретение относится к специфическому для антигена-мишени химерному антителу/Т-клеточному рецептору (abTCR), который специфически связывает антиген-мишень (такой как антиген клеточной поверхности или комплекс пептид/МНС) и является способным привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR-передающий сигналы модуль (такой как CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\zeta\eta$ или $\zeta\zeta$). В некоторых вариантах осуществления, abTCR содержит первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь. В некоторых вариантах осуществления, первая и вторая полипептидные цепи связаны, например, посредством ковалентной связи (например, пептидной или другой химической связи) или нековалентной связи. В некоторых вариантах осуществления, abTCR представляет собой гетеродимер, содержащий первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством по меньшей мере одной дисульфидной связи. Специфичность abTCR происходит из группы антитела, придающей специфичность связывания с антигеном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления, группа антитела представляет собой подобный Fab антигенсвязывающий модуль, содержащий домены V_H, C_{H1}, V_L, и C_L антитела. В некоторых вариантах осуществления, группа антитела представляет собой подобный Fv антигенсвязывающий модуль, содержащий домены V_H и V_L антитела. Способность abTCR привлекать ассоциированный с TCR-передающий сигналы модуль происходит из модуля Т-клеточного рецептора (TCRM). В некоторых вариантах осуществления, TCRM содержит трансмембранный модуль из TCR (такой как $\alpha\beta$ TCR или $\gamma\delta$ TCR). В некоторых вариантах осуществления, TCRM дополнительно содержит один или оба из соединительных пептидов или их фрагментов из TCR. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный модуль и соединительные пептиды или их фрагменты происходят из одного и того же типа TCR ($\alpha\beta$ или $\gamma\delta$). В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный модуль происходит из TCR $\alpha\beta$, и соединительные пептиды или их фрагменты происходят из TCR $\gamma\delta$, или трансмембранный модуль происходит из TCR $\gamma\delta$, и соединительные пептиды или их фрагменты происходят из TCR $\alpha\beta$. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько из по меньшей мере одного внутриклеточного домена abTCR содержат последовательность из внутриклеточного домена TCR. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько из по меньшей мере одного внутриклеточного домена abTCR содержат Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность. Костимулирующая передающая сигналы последовательность может составлять часть внутриклеточного домена костимулирующей молекулы, включая, например, CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, ICOS, ассоциированный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лиганд, который специфически связывается с CD83, и т.п. В некоторых вариантах осуществления, группа антитела содержится в внеклеточном домене abTCR. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит один или несколько пептидных линкеров между группой антитела и TCRM для

оптимизации длины внеклеточного домена. В некоторых вариантах осуществления, ссылка на антигенсвязывающий модуль (такой как подобный Fab или подобный Fv антигенсвязывающий модуль), специфически связывающий антиген-мишень, означает, что антигенсвязывающий модуль связывает антиген-мишень с а) аффинностью, которая по меньшей мере приблизительно в 10 (включая, например, по меньшей мере приблизительно любое из 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000 или более) раз превышает его аффинность связывания для других молекул; или б) K_d , которая составляет не более, чем приблизительно 1/10 (например, не более, чем приблизительно любое из 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50, 1/75, 1/100, 1/200, 1/300, 1/400, 1/500, 1/750, 1/1000 или менее) от его K_d для связывания с другими молекулами. Аффинность связывания можно определять способами, известными в данной области, такими как ELISA, анализ активированной флуоресценцией сортировки клеток (FACS), или анализ радиоиммунопреципитации (RIA). K_d можно определять способами, известными в данной области, такими как анализ поверхностного плазмонного резонанса (SPR), с использованием, например, устройств Biacore, или анализа кинетического исключения (KinExA) с использованием, например, устройств Sapidyne.

[0141] Предусмотренные конструкции abTCR включают, например, abTCR, которые специфически связываются с антигенами клеточной поверхности, и abTCR, которые специфически связываются с представленными на клеточной поверхности комплексами пептид/МНС.

[0142] В некоторых вариантах осуществления, abTCR содержит подобный Fab антигенсвязывающий модуль содержащий а) первую полипептидную цепь, содержащую первый антигенсвязывающий домен, содержащий домен V_H антитела и домен C_H1 антитела, и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй антигенсвязывающий домен, содержащий домен V_L антитела и домен C_L антитела. В некоторых вариантах осуществления, первый антигенсвязывающий домен содержит домен V_H антитела с amino-конца от домена C_H1 антитела, и/или второй антигенсвязывающий домен содержит домен V_L антитела с amino-конца от домена C_L антитела. В некоторых вариантах осуществления, присутствует пептидный линкер между доменами V_L и C_L антитела и/или пептидный линкер между доменами V_H и C_H1 антитела. В некоторых вариантах осуществления, все из CDR домена V_L антитела и домена V_H антитела происходят из одной и той же группы антитела. В некоторых вариантах осуществления, домен V_L антитела и домен V_H антитела содержат CDR антитела, происходящие из более, чем одной группы антитела. В некоторых вариантах осуществления, домен V_L антитела содержит CDR антитела, происходящие из домена V_H антитела и/или домен V_H антитела содержит CDR антитела, происходящие из домена V_L антитела. В некоторых вариантах осуществления, домен V_L антитела содержит каркасные области, происходящие из одного антитела, и одну или несколько CDR, происходящие из другого антитела, и/или домен V_H антитела содержит каркасные области, происходящие из одного антитела, и одну или несколько CDR, происходящие из другого антитела. В некоторых вариантах осуществления, первая и вторая полипептидные цепи связаны, например, посредством ковалентной связи (например, пептидной или другой химической связи) или нековалентной связи. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй антигенсвязывающий домены связаны посредством дисульфидной связи. В

некоторых вариантах осуществления, первый и второй антигенсвязывающий домены связаны посредством дисульфидной связи между остатком в домене C_{H1} и остатком в домене C_L. В некоторых вариантах осуществления, домен C_{H1} происходит из тяжелой цепи IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgA (например, IgA1 или IgA2), IgD, IgM или IgE, необязательно, человека. В некоторых вариантах осуществления, домен C_{H1} содержит (например, состоит из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 39 и 60-69). В некоторых вариантах осуществления, домен C_{H1} представляет собой вариант, содержащий одну или несколько модификаций (например, замен, вставок и/или делеций аминокислот) по сравнению с последовательностью, из которой он происходит. В некоторых вариантах осуществления, домен C_L происходит из легкой цепи каппа или ламбда, необязательно, человека. В некоторых вариантах осуществления, домен C_L содержит (например, состоит из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления, домен C_L представляет собой вариант, содержащий одну или несколько модификаций (например, замен, вставок и/или делеций аминокислот) по сравнению с последовательностью, из которой он происходит. В некоторых вариантах осуществления, домены C_{H1} и/или C_L содержат одну или несколько модификаций, которые по существу не изменяют аффинность их связывания друг с другом. В некоторых вариантах осуществления, домены C_{H1} и/или C_L содержат одну или несколько модификаций, которые увеличивают аффинность их связывания друг с другом и/или вводят не встречающуюся в природе дисульфидную связь. В некоторых вариантах осуществления, домены C_{H1} и C_L содержат модификацию выступ-во-впадину (см., например, Carter P. J Immunol Methods. 248:7-15, 2001). В некоторых вариантах осуществления, домены C_{H1} и C_L модифицируют посредством управления электростатическими взаимодействиями для усиления их ассоциации друг с другом (см., например, WO2006106905 и Gunasekaran K, et al. J Biol Chem. 285:19637-46, 2010). В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным, химерным, полусинтетическим или полностью синтетическим.

[0143] В некоторых вариантах осуществления, abTCR содержит подобный Fab антигенсвязывающий модуль, содержащий а) первую полипептидную цепь, содержащую первый антигенсвязывающий домен, содержащий домен V_L антитела и домен C_{H1} антитела, и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй антигенсвязывающий домен, содержащий домен V_H антитела и домен C_L антитела. В некоторых вариантах осуществления, первый антигенсвязывающий домен содержит домен V_L антитела с amino-конца от домена C_{H1} антитела, и/или второй антигенсвязывающий домен содержит домен V_H антитела с amino-конца от домена C_L антитела. В некоторых вариантах осуществления, присутствует пептидный линкер между доменами V_H и C_L антитела и/или пептидный линкер между доменами V_L и C_{H1} антитела. В некоторых вариантах осуществления, все из CDR домена V_L антитела и домена V_H антитела происходят из одной и той же группы антитела. В некоторых вариантах осуществления, домен V_L антитела и домен V_H антитела содержат CDR антитела, происходящие из более, чем одной группы антитела. В некоторых вариантах осуществления, домен V_L антитела содержит CDR антитела, происходящие из домена V_H антитела, и/или домен

V_H антитела содержит CDR антитела, происходящие из домена V_L антитела. В некоторых вариантах осуществления, домен V_L антитела содержит каркасные области, происходящие из одного антитела, и одну или несколько CDR, происходящие из другого антитела, и/или домен V_H антитела содержит каркасные области, происходящие из одного антитела, и одну или несколько CDR, происходящие из другого антитела. В некоторых вариантах осуществления, первая и вторая полипептидные цепи связаны, например, посредством ковалентной связи (например, пептидной или другой химической связи) или нековалентной связи. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй антигенсвязывающий домены связаны посредством дисульфидной связи. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй антигенсвязывающий домены связаны посредством дисульфидной связи между остатком в домене $CH1$ и остатком в домене C_L . В некоторых вариантах осуществления, домен $CH1$ происходит из тяжелой цепи IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgA (например, IgA1 или IgA2), IgD, IgM или IgE, необязательно, человека. В некоторых вариантах осуществления, домен $CH1$ содержит (например, состоит из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 39 и 60-69). В некоторых вариантах осуществления, домен $CH1$ представляет собой вариант, содержащий одну или несколько модификаций (например, замен, вставок и/или делеций аминокислот) по сравнению с последовательностью, из которой он происходит. В некоторых вариантах осуществления, домен C_L происходит из легкой цепи каппа или лямбда, необязательно, человека. В некоторых вариантах осуществления, домен C_L содержит (например, состоит из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления, домен C_L представляет собой вариант, содержащий одну или несколько модификаций (например, замен, вставок и/или делеций аминокислот) по сравнению с последовательностью, из которой он происходит. В некоторых вариантах осуществления, домены $CH1$ и/или C_L содержат одну или несколько модификаций, которые по существу не изменяют аффинность их связывания друг с другом. В некоторых вариантах осуществления, домены $CH1$ и/или C_L содержат одну или несколько модификаций, которые увеличивают аффинность их связывания друг с другом и/или вводят не встречающуюся в природе дисульфидную связь. В некоторых вариантах осуществления, домены $CH1$ и CL содержат модификацию выступ-во-впадину (см., например, Carter P. J Immunol Methods. 248:7-15, 2001). В некоторых вариантах осуществления, домены $CH1$ и C_L модифицируют посредством управления электростатическими взаимодействиями для усиления их ассоциации друг с другом (см., например, WO2006106905 и Gunasekaran K, et al. J Biol Chem. 285:19637-46, 2010). В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным, химерным, полусинтетическим или полностью синтетическим.

[0144] В некоторых вариантах осуществления, abTCR содержит подобный Fv антигенсвязывающий модуль, содержащий а) первую полипептидную цепь, содержащую первый антигенсвязывающий домен, содержащий домен V_H антитела, и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй антигенсвязывающий домен, содержащий домен V_L антитела. В некоторых вариантах осуществления, присутствует первый пептидный линкер, слитый с С-концом домена V_L антитела и/или второй пептидный линкер, слитый с С-концом домена V_H антитела. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй пептидные линкеры способны связываться друг с другом. В некоторых

вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры происходят из константных областей тяжелой и/или легкой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры содержат домен СН3 антитела или его вариант. В некоторых вариантах осуществления, константные домены тяжелой цепи иммуноглобулина (например, С_H1 или СН3), содержащиеся в пептидных линкерах, происходят из тяжелой цепи IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgA (например, IgA1 или IgA2), IgD, IgM или IgE, необязательно, человека. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры происходят из константных областей субъединицы TCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры происходят из а) константных доменов субъединицы α и β TCR; или б) константных доменов субъединицы γ и δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры являются синтетическими. В некоторых вариантах осуществления, все из CDR домена V_L антитела и домена V_H антитела происходят из одной и той же группы антитела. В некоторых вариантах осуществления, домен V_L антитела и домен V_H антитела содержат CDR антитела, происходящие из более, чем одной группы антитела. В некоторых вариантах осуществления, домен V_L антитела содержит CDR антитела, происходящие из домена V_H антитела, и/или домен V_H антитела содержит CDR антитела, происходящие из домена V_L антитела. В некоторых вариантах осуществления, домен V_L антитела содержит каркасные области, происходящие из одного антитела, и одну или несколько CDR, происходящие из другого антитела, и/или домен V_H антитела содержит каркасные области, происходящие из одного антитела, и одну или несколько CDR, происходящие из другого антитела. В некоторых вариантах осуществления, первая и вторая полипептидные цепи связаны, например, посредством ковалентной связи (например, пептидной или другой химической связи) или нековалентной связи. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй антигенсвязывающий домены связаны посредством дисульфидной связи. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй пептидные линкеры связаны посредством дисульфидной связи. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидный линкер представляет собой вариант, содержащий одну или несколько модификаций (например, замен, вставок и/или делеций аминокислот) по сравнению с последовательностью, из которой он происходит. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры содержат один или несколько модификации, которые по существу не изменяют аффинность их связывания друг с другом. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры содержат один или несколько модификации, которые увеличивают аффинность их связывания друг с другом и/или вводят не встречающуюся в природе дисульфидную связь. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй пептидные линкеры содержат модификацию выступ-во-впадину (см., например, Carter P. J Immunol Methods. 248:7-15, 2001). В некоторых вариантах осуществления, первый и второй пептидные линкеры модифицируют посредством управления электростатическими взаимодействиями для усиления их ассоциации друг с другом (см., например, WO 2006106905 и Gunasekaran K, et al. J Biol Chem. 285:19637-46, 2010). В некоторых вариантах осуществления, подобный Fv антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным, химерным, полусинтетическим или полностью синтетическим.

[0145] В некоторых вариантах осуществления, группа антитела (например, подобный

Fab антигенсвязывающий модуль или подобный Fv антигенсвязывающий модуль) является полусинтетической, содержащей полностью человеческие последовательности и одну или несколько синтетических областей. В некоторых вариантах осуществления, группа антитела является полусинтетической, содержащий полностью человеческий V_L и полусинтетический V_H , содержащий полностью человеческие области FR1, HC-CDR1, FR2, HC-CDR2, FR3 и FR4, и синтетический HC-CDR3. В некоторых вариантах осуществления, полусинтетический V_H содержит полностью синтетический HC-CDR3, обладающий последовательностью длиной от приблизительно 5 до приблизительно 25 (такой как приблизительно любая из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, полусинтетический V_H или синтетический HC-CDR3 получен из полусинтетической библиотеки (такой как полусинтетическая человеческая библиотека), содержащей полностью синтетические области HC-CDR3, обладающие последовательностью длиной от приблизительно 5 до приблизительно 25 (такой как приблизительно любая из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25) аминокислот, где каждая аминокислота в последовательности случайным образом выбрана из стандартных человеческих аминокислот, минус цистеин. В некоторых вариантах осуществления, синтетический HC-CDR3 обладает длиной от приблизительно 10 до приблизительно 19 (такой как приблизительно любая из 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или 19) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, группа антитела является полусинтетической, содержащей полусинтетический V_L и полусинтетический V_H . В некоторых вариантах осуществления, группа антитела является полностью синтетической, содержащей антитела с фиксированными человеческими парами каркасных областей V_H/V_L , но с рандомизированными и синтетическими последовательностями для всех 6 CDR как в тяжелых, так и в легких цепях.

[0146] Группа антитела (например, подобный Fab антигенсвязывающий модуль или подобный Fv антигенсвязывающий модуль) в некоторых вариантах осуществления содержит специфические последовательности CDR, происходящие из одной или нескольких групп антитела (таких как моноклональное антитело), или конкретные варианты таких последовательностей, содержащие одну или несколько аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления, аминокислотные замены в варианте последовательности по существу не уменьшают способность группы антитела связывать антиген-мишень. Предусмотрены также изменения, которые по существу улучшают аффинность связывания антигена-мишени или влияют на какое-либо другое свойство, такое как специфичность и/или перекрестная реакционная способность применительно к родственным вариантам антигена-мишени.

[0147] TCRM содержит а) первую полипептидную цепь, содержащую первый T-клеточный рецептор домен (TCRD), содержащий первый трансмембранный домен, и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй TCRD, содержащий второй трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления, первый трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен первой субъединицы TCR, и/или второй трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен второй субъединицы TCR. В некоторых вариантах осуществления, первая субъединица TCR представляет собой цепь α TCR (например, No доступа в GenBank: CCI73895), и вторая субъединица TCR представляет собой цепь β TCR (например, No доступа в GenBank: CCI73893). В некоторых вариантах осуществления, первая субъединица TCR представляет собой цепь β TCR, и вторая

субъединица TCR представляет собой цепь α TCR. В некоторых вариантах осуществления, первая субъединица TCR представляет собой цепь γ TCR (например, No доступа в GenBank: AGE91788), и вторая субъединица TCR представляет собой цепь δ TCR (например, No доступа в GenBank: AAQ57272). В некоторых вариантах осуществления, первая субъединица TCR представляет собой цепь δ TCR, и вторая субъединица TCR представляет собой цепь γ TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй трансмембранные домены содержат (например, состоят из), индивидуально, трансмембранный домен, содержащийся в одной из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 77-80. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй трансмембранные домены содержат (например, состоят из), индивидуально, любой из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 1-4. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит первый соединительный пептид с amino-конца от трансмембранного домена, и/или второй TCRD дополнительно содержит второй соединительный пептид с amino-конца от трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления, первый соединительный пептид содержит весь или часть соединительного пептида первой субъединицы TCR, и/или второй соединительный пептид содержит весь или часть соединительного пептида из второй субъединицы TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый трансмембранный домен и первый соединительный пептид происходят из различных субъединиц TCR, и/или второй трансмембранный домен и второй соединительный пептид происходят из различных субъединиц TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй соединительные пептиды содержат (например, состоят из), индивидуально, соединительный пептид или его фрагмент, содержащийся в одной из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 77-80. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй соединительные пептиды содержат (например, состоят из), индивидуально, любую из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 5-12. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит первый внутриклеточный домен TCR с карбокси-конца от первого трансмембранного домена, и/или второй TCRD дополнительно содержит второй внутриклеточный домен TCR с карбокси-конца от второго трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления, первый внутриклеточный домен TCR содержит весь или часть внутриклеточного домена первой субъединицы TCR, и/или второй внутриклеточный домен TCR содержит весь или часть внутриклеточного домена из второй субъединицы TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй внутриклеточные домены TCR содержат, индивидуально, весь или часть внутриклеточного домена, содержащегося в любой из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 77-80. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй внутриклеточные домены TCR содержат, индивидуально, любую из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 13-14. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD представляет собой фрагмент первой субъединицы TCR, и/или второй TCRD представляет собой фрагмент второй цепи TCR. В некоторых вариантах осуществления, первая и вторая полипептидные цепи связаны, например, посредством ковалентной связи (например, пептидной или другой химической связи) или нековалентной связи. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй TCRD связаны посредством дисульфидной связи. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй TCRD связаны посредством дисульфидной связи между остатком в первом соединительном пептиде и остатком во втором соединительном пептиде. В некоторых вариантах осуществления, TCRM является способным привлекать по меньшей

мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль, выбранный из группы, состоящей из CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\gamma\epsilon$ и $\zeta\zeta$. В некоторых вариантах осуществления, TCRM является способным привлекать каждый из CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\gamma\epsilon$ и $\zeta\zeta$ для формирования октамерного комплекса abTCR-CD3 (т.е., способствует формированию комплекса abTCR-CD3).

5 [0148] В некоторых вариантах осуществления, abTCR представляет собой молекулу, содержащую первую полипептидную цепь группы антитела (например, подобный Fab антигенсвязывающий модуль или подобный Fv антигенсвязывающий модуль), слитую с амино-концом первой полипептидной цепи TCRM, таким образом, формируя первую полипептидную цепь abTCR, и вторую полипептидную цепь группы антитела, слитую
10 с амино-концом второй полипептидной цепи TCRM, таким образом, формируя вторую полипептидную цепь abTCR. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит первый пептидный линкер между первой полипептидной цепью группы антитела и первой полипептидной цепью TCRM, и/или второй пептидный линкер между второй полипептидной цепью группы антитела и второй полипептидной
15 цепью TCRM. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидный линкер обладает длиной между приблизительно 5 и приблизительно 70 (такой как приблизительно любая из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 или 70, включая любые диапазоны между этими значениями) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь abTCR дополнительно содержит первый
20 сигнальный пептид с амино-конца от первого антигенсвязывающего домена, и/или вторая полипептидная цепь abTCR дополнительно содержит второй сигнальный пептид с амино-конца от второго антигенсвязывающего домена. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах
25 осуществления, первая полипептидная цепь abTCR дополнительно содержит первый вспомогательный внутриклеточный домен с карбокси-конца от первого трансмембранного домена, и/или вторая полипептидная цепь abTCR дополнительно содержит второй вспомогательный внутриклеточный домен с карбокси-конца от второго трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления, первый
30 и/или второй вспомогательный внутриклеточный домены содержат костимулирующий домен TCR. В некоторых вариантах осуществления, костимулирующий домен TCR содержит всю или часть аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 70 или 71. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй вспомогательный
внутриклеточный домены содержат эпитоп-метку. В некоторых вариантах
35 осуществления, эпитоп-метка содержит любую из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая и вторая полипептидные цепи abTCR связаны, например, посредством ковалентной связи (например, пептидной или другой химической связи) или нековалентной связи. В некоторых вариантах осуществления, abTCR представляет собой гетеродимер.

40 [0149] В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой антиген клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности выбран из группы, состоящей из белка, углевода и липида. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой ассоциированный с заболеванием антиген, экспрессированный в пораженной
45 заболеванием клетке. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой комплекс, содержащий пептид и белок МНС. Комплексы пептид/МНС включают, например, представленный на поверхности комплекс, содержащий пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена,

экспрессированного в пораженной заболеванием клетке, и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления, полноразмерный ассоциированный с заболеванием антиген в норме не экспрессирован на поверхности пораженной заболеванием клетки (например, ассоциированный с заболеванием антиген представляет собой внутриклеточный или секретлируемый белок). В некоторых вариантах осуществления, заболевание представляет собой злокачественную опухоль, и ассоциированный с заболеванием антиген представляет собой опухолеассоциированный антиген, экспрессированный на злокачественной клетке. В некоторых вариантах осуществления, опухолеассоциированный антиген представляет собой онкобелок. В некоторых вариантах осуществления, онкобелок является результатом мутации в протоонкогене, и онкобелок содержит неопитоп, содержащий мутацию. Например, в некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой опухолеассоциированный антиген клеточной поверхности (например, онкобелок, содержащий неопитоп). В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой комплекс, содержащий пептид, происходящий из опухолеассоциированного антигена (например, онкобелка, содержащего неопитоп), в норме не экспрессированного на поверхности злокачественной клетки (например, внутриклеточного или секретлируемого опухолеассоциированного антигена), и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления, заболевание представляет собой вирусную инфекцию, и ассоциированный с заболеванием антиген представляет собой ассоциированный с вирусом антиген, экспрессированный на инфицированной клетке. Например, в некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой ассоциированный с вирусом антиген клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой комплекс, содержащий пептид, происходящий из ассоциированного с вирусом антигена, в норме не экспрессированного на поверхности инфицированной вирусом клетки (например, внутриклеточного или секретлируемого ассоциированного с вирусом антигена), и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления, конструкция абТСR связывает антиген-мишень с K_d между приблизительно 0,1 пМ и приблизительно 500 нМ (такой как приблизительно любая из 0,1 пМ, 1,0 пМ, 10 пМ, 50 пМ, 100 пМ, 500 пМ, 1 нМ, 10 нМ, 50 нМ, 100 нМ, или 500 нМ, включая любые диапазоны между этими значениями).

[0150] В некоторых вариантах осуществления, абТСR содержит группу антитела (например, подобный Fab антигенсвязывающий модуль или подобный Fv антигенсвязывающий модуль), которая специфически связывается с антигеном клеточной поверхности, где антиген клеточной поверхности представляет собой CD19, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D или FCRL5. Специфическое связывание с полноразмерным антигеном, например, антигеном клеточной поверхности, иногда обозначают как «не рестрицированное по МНС связывание».

[0151] В некоторых вариантах осуществления, абТСR содержит группу антитела (например, подобный Fab антигенсвязывающий модуль или подобный Fv антигенсвязывающий модуль), которая специфически связывается с комплексом, содержащим пептид и белок МНС, где пептид происходит из белка, выбранного из группы, состоящей из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1, и PSA. Специфическое связывание с комплексом, содержащим пептид и белок МНС, иногда обозначают как «рестрицированное по МНС связывание».

[0152] В некоторых вариантах осуществления, абТСR содержит группу антитела (например, подобный Fab антигенсвязывающий модуль или подобный Fv антигенсвязывающий модуль), которая специфически связывается с комплексом,

содержащим пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген), и белок МНС класса I, где белок МНС класса I представляет собой HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, или HLA-G. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I

5 представляет собой HLA-A, HLA-B или HLA-C. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-A. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-B. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-C. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-A01, HLA-A02, HLA-A03, HLA-A09, HLA-

10 A10, HLA-A11, HLA-A19, HLA-A23, HLA-A24, HLA-A25, HLA-A26, HLA-A28, HLA-A29, HLA-A30, HLA-A31, HLA-A32, HLA-A33, HLA-A34, HLA-A36, HLA-A43, HLA-A66, HLA-A68, HLA-A69, HLA-A74 или HLA-A80. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-A02. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой любой из HLA-A*02:01-555, такой как HLA-

15 A*02:01, HLA-A*02:02, HLA-A*02:03, HLA-A*02:04, HLA-A*02:05, HLA-A*02:06, HLA-A*02:07, HLA-A*02:08, HLA-A*02:09, HLA-A*02:10, HLA-A*02:11, HLA-A*02:12, HLA-A*02:13, HLA-A*02:14, HLA-A*02:15, HLA-A*02:16, HLA-A*02:17, HLA-A*02:18, HLA-A*02:19, HLA-A*02:20, HLA-A*02:21, HLA-A*02:22 или HLA-A*02:24. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-A*02:01.

20 [0153] В некоторых вариантах осуществления, абTCR содержит группу антитела (например, подобный Fab антигенсвязывающий модуль или подобный Fv антигенсвязывающий модуль), которая специфически связывается с комплексом, содержащим пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген), и белок МНС

25 класса II, где белок МНС класса II представляет собой HLA-DP, HLA-DQ или HLA-DR. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса II представляет собой HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса II представляет собой HLA-DQ. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса II представляет собой HLA-DR.

30 [0154] Например, некоторые варианты осуществления относятся к абTCR (такому как выделенный абTCR), содержащему а) подобный Fab антигенсвязывающий модуль, специфически связывающий антиген-мишень, и б) TCRM, способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль содержит домен

35 V_H антитела, домен C_{H1} антитела, домен V_L антитела и домен C_L антитела. В некоторых вариантах осуществления, домен C_{H1} происходит из тяжелой цепи IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), необязательно, человека. В некоторых вариантах осуществления, домен C_{H1} представляет собой вариант, содержащий одну или несколько модификаций

40 (например, замен, вставок и/или делеций аминокислот) по сравнению с последовательностью, из которой он происходит. В некоторых вариантах осуществления, домен C_L происходит из легкой цепи каппа или лямбда, необязательно, человека. В некоторых вариантах осуществления, домен C_L представляет собой вариант, содержащий одну или несколько модификаций (например, замен, вставок и/или делеций

45 аминокислот) по сравнению с последовательностью, из которой он происходит. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным, химерным, полусинтетическим или полностью синтетическим. В некоторых вариантах осуществления, TCRM содержит

трансмембранные домены TCR, такого как $\alpha\beta$ TCR или $\gamma\delta$ TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCRM дополнительно содержит соединительные пептиды или их фрагменты из TCR, такого как $\alpha\beta$ TCR или $\gamma\delta$ TCR. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранные домены и соединительные пептиды происходят из $\alpha\beta$ TCR или $\gamma\delta$ TCR. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранные домены происходят из $\alpha\beta$ TCR, и соединительные пептиды происходят из $\gamma\delta$ TCR, или трансмембранные домены происходят из $\gamma\delta$ TCR, и соединительные пептиды происходят из $\alpha\beta$ TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCRM дополнительно содержит по меньшей мере одну часть внеклеточного домена TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCRM дополнительно содержит по меньшей мере один внутриклеточный домен TCR, содержащий последовательность из внутриклеточного домена TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCRM содержит фрагменты субъединиц TCR. В некоторых вариантах осуществления, $\alpha\beta$ TCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий T-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или мус). В некоторых вариантах осуществления, $\alpha\beta$ TCR дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого антигенсвязывающего домена и/или второй сигнальный пептид с amino-конца от второго антигенсвязывающего домена. В некоторых вариантах осуществления, $\alpha\beta$ TCR дополнительно содержит по меньшей мере одну дисульфидную связь. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль содержит дисульфидную связь, и/или TCRM содержит дисульфидную связь. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль содержит дисульфидную связь между остатком в домене CN1 и остатком в домене CL, и/или TCRM содержит дисульфидную связь между остатком в первом соединительном пептиде и остатком во втором соединительном пептиде. В некоторых вариантах осуществления, TCRM является способным привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль, выбранный из группы, состоящей из CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\gamma\epsilon$ и $\zeta\zeta$. В некоторых вариантах осуществления, TCRM способствует формированию комплекса $\alpha\beta$ TCR-CD3. В некоторых вариантах осуществления, присутствует пептидный линкер между подобным Fab антигенсвязывающим модулем и TCRM. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой антиген клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности выбран из группы, состоящей из белка, углевода и липида. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой ассоциированный с заболеванием антиген, такой как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой CD19, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D или FCRL5. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой представленный на поверхности комплекс пептид/МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген), и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид и белок МНС, где пептид происходит из белка, выбранного из группы, состоящей из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1 и PSA. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС представляет собой белок МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-A. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A

представляет собой HLA-A02. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A02 представляет собой HLA-A*02:01.

[0155] Некоторые варианты осуществления относятся к abTCR (такому как выделенный abTCR), содержащему а) подобный Fv антигенсвязывающий модуль, специфически связывающий антиген-мишень, и б) TCRM, способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль, где антиген-мишень представляет собой комплекс пептид/МНС. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fv антигенсвязывающий модуль содержит домен V_H антитела и домен V_L антитела. В некоторых вариантах осуществления, присутствует первый пептидный линкер, слитый с С-концом домена V_L антитела, и/или второй пептидный линкер, слитый с С-концом домена V_H антитела. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй пептидные линкеры способны связываться друг с другом. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры происходят из константных областей тяжелой и/или легкой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры происходят из константных областей субъединицы TCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры происходят из а) константных доменов субъединиц α и β TCR; или б) константных доменов субъединиц γ и δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры являются синтетическими. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fv антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным, химерным, полусинтетическим или полностью синтетическим. В некоторых вариантах осуществления, TCRM содержит трансмембранные домены TCR, такого как $\alpha\beta$ TCR или $\gamma\delta$ TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCRM дополнительно содержит соединительные пептиды или их фрагменты TCR, такого как $\alpha\beta$ TCR или $\gamma\delta$ TCR. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранные домены и соединительные пептиды происходят из $\alpha\beta$ TCR или $\gamma\delta$ TCR. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранные домены происходят из $\alpha\beta$ TCR, и соединительные пептиды происходят из $\gamma\delta$ TCR, или трансмембранные домены происходят из $\gamma\delta$ TCR, и соединительные пептиды происходят из $\alpha\beta$ TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCRM дополнительно содержит по меньшей мере одну часть внеклеточного домена TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCRM дополнительно содержит по меньшей мере один внутриклеточный домен TCR, содержащий последовательность из внутриклеточного домена TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCRM содержит фрагменты субъединиц TCR. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или мус). В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит первый сигнальный пептид с аминоконца от первого антигенсвязывающего домена и/или второй сигнальный пептид с аминоконца от второго антигенсвязывающего домена. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере одну дисульфидную связь. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры содержат дисульфидную связь, и/или TCRM содержит дисульфидную связь. В некоторых вариантах осуществления, TCRM содержит дисульфидную связь между остатком в первом соединительном пептиде и остатком во втором соединительном пептиде. В

некоторых вариантах осуществления, TCRM является способным привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль выбранный из группы, состоящей из CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\gamma\epsilon$ и $\zeta\zeta$. В некоторых вариантах осуществления, TCRM способствует формированию комплекса abTCR-CD3. В некоторых вариантах

5 осуществления, комплекс пептид антигена-мишени/МНС содержит пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген) и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид и белок МНС, где пептид происходит из белка, выбранного из группы, состоящей из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-

10 LMP2A, HIV-1 и PSA. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС представляет собой белок МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-A. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A представляет собой HLA-A02. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A02 представляет собой HLA-A*02:01.

15 [0156] некоторые варианты осуществления относятся к abTCR, который специфически узнает антиген-мишень, содержащему а) первую полипептидную цепь, содержащую первый антигенсвязывающий домен, содержащий домены V_H и C_H1 антитела, и первый TCRD, содержащий трансмембранный домен первой субъединицы TCR; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй антигенсвязывающий домен, содержащий

20 домены V_L и C_L антитела, и второй TCRD, содержащий трансмембранный домен второй субъединицы TCR, где домены V_H и C_H1 первого антигенсвязывающего домена и домены V_L и C_L второго антигенсвязывающего домена формируют подобный Fab антигенсвязывающий модуль, который специфически связывает антиген-мишень, где

25 первый TCRD и второй TCRD формируют TCRM, способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным, химерным, полусинтетическим или полностью синтетическим. В некоторых вариантах осуществления, первая субъединица TCR представляет собой

30 цепь α TCR, и вторая субъединица TCR представляет собой цепь β TCR. В некоторых вариантах осуществления, первая субъединица TCR представляет собой цепь β TCR, и вторая субъединица TCR представляет собой цепь α TCR. В некоторых вариантах осуществления, первая субъединица TCR представляет собой цепь γ TCR, и вторая субъединица TCR представляет собой цепь δ TCR. В некоторых вариантах

35 осуществления, первая субъединица TCR представляет собой цепь δ TCR, и вторая субъединица TCR представляет собой цепь γ TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит соединительный пептид или его фрагмент из первой субъединицы TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит соединительный пептид или его фрагмент из второй субъединицы TCR. В некоторых вариантах

40 осуществления, первый TCRD дополнительно содержит часть внеклеточного домена из первой субъединицы TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит часть внеклеточного домена из второй субъединицы TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит первый внутриклеточный домен TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит второй внутриклеточный домен

45 TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый внутриклеточный домен TCR содержит последовательность из внутриклеточного домена первой субъединицы TCR, и/или второй внутриклеточный домен TCR содержит последовательность из внутриклеточного домена из второй субъединицы TCR. В некоторых вариантах

осуществления, первый TCRD представляет собой фрагмент первой субъединицы TCR, и/или второй TCRD представляет собой фрагмент второй цепи TCR. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или мус). В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого антигенсвязывающего домена, и/или второй сигнальный пептид с amino-конца от второго антигенсвязывающего домена. В некоторых вариантах осуществления, TCRM является способным привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль, выбранный из группы, состоящей из CD3δ, CD3γ и ζζ. В некоторых вариантах осуществления, TCRM способствует формированию комплекса abTCR-CD3. В некоторых вариантах осуществления, присутствует первый пептидный линкер между первым антигенсвязывающим доменом и первым TCRD и/или второй пептидный линкер между вторым антигенсвязывающим доменом и вторым TCRD. В некоторых вариантах осуществления, первая и вторая полипептидные цепи связаны, например, посредством ковалентной связи (например, пептидной или другой химической связи) или нековалентной связи. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством а) дисульфидной связи между остатком в соединительном пептиде из первого TCRD и остатком в соединительном пептиде из второго TCRD; и/или б) дисульфидной связи между остатком в домене C_H1 антитела в первом антигенсвязывающем домене и остатком в домене C_L антитела во втором антигенсвязывающем домене. В некоторых вариантах осуществления, домен C_H1 происходит из тяжелой цепи IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), необязательно, человека. В некоторых вариантах осуществления, домен C_H1 представляет собой вариант, содержащий одну или несколько модификаций (например, замен, вставок и/или делеций аминокислот) по сравнению с последовательностью, из которой он происходит. В некоторых вариантах осуществления, домен C_L происходит из легкой цепи каппа или лямбда, необязательно, человека. В некоторых вариантах осуществления, домен C_L представляет собой вариант, содержащий одну или несколько модификаций (например, замен, вставок и/или делеций аминокислот) по сравнению с последовательностью, из которой он происходит. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой антиген клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности выбран из группы, состоящей из белка, углевода и липида. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой ассоциированный с заболеванием антиген, такой как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой CD19, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D или FCRL5. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой представленный на поверхности комплекс пептид/МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген), и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид и белок МНС, где пептид происходит из белка, выбранного из группы, состоящей из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1 и PSA. В некоторых вариантах

осуществления, белок МНС представляет собой белок МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-A. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A представляет собой HLA-A02. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A02 представляет собой HLA-A*02:01.

5 [0157] Некоторые варианты осуществления относятся к abTCR, который специфически узнает антиген-мишень, содержащему а) первую полипептидную цепь, содержащую первый антигенсвязывающий домен, содержащий домен V_H антитела, и первый TCRD, содержащий трансмембранный домен первой субъединицы TCR; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй антигенсвязывающий домен, содержащий домен V_L антитела и второй TCRD содержащий трансмембранный домен второй субъединицы TCR, где V_H домен первого антигенсвязывающего домена и домен V_L второго антигенсвязывающего домена формируют подобный Fv антигенсвязывающий модуль, который специфически связывает антиген-мишень, где первый TCRD и второй TCRD формируют TCRM, способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль, и где антиген-мишень представляет собой комплекс пептид/МНС. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fv антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным, химерным, полусинтетическим или полностью синтетическим. В некоторых вариантах осуществления, первая субъединица TCR представляет собой цепь α TCR, и вторая субъединица TCR представляет собой цепь β TCR. В некоторых вариантах осуществления, первая субъединица TCR представляет собой цепь β TCR, и вторая субъединица TCR представляет собой цепь α TCR. В некоторых вариантах осуществления, первая субъединица TCR представляет собой цепь γ TCR, и вторая субъединица TCR представляет собой цепь δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, первая субъединица TCR представляет собой цепь δ TCR, и вторая субъединица TCR представляет собой цепь γ TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит соединительный пептид или его фрагмент из первой субъединицы TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит соединительный пептид или его фрагмент из второй субъединицы TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит часть внеклеточного домена первой субъединицы TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит часть внеклеточного домена из второй субъединицы TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит первый внутриклеточный домен TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит второй внутриклеточный домен TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый внутриклеточный домен TCR содержит последовательность из внутриклеточного домена первой субъединицы TCR, и/или второй внутриклеточный домен TCR содержит последовательность из внутриклеточного домена из второй субъединицы TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD представляет собой фрагмент первой субъединицы TCR, и/или второй TCRD представляет собой фрагмент второй цепи TCR. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий T-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или myc). В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого антигенсвязывающего домена и/или второй сигнальный пептид с amino-конца от второго антигенсвязывающего домена. В некоторых вариантах

осуществления, TCRM является способным привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль выбранный из группы, состоящей из CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\gamma\epsilon$ и $\zeta\zeta$. В некоторых вариантах осуществления, TCRM способствует формированию комплекса abTCR-CD3. В некоторых вариантах осуществления,

5 присутствует первый пептидный линкер между первым антигенсвязывающим доменом и первым TCRD и/или второй пептидный линкер между вторым антигенсвязывающим доменом и вторым TCRD. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры происходят из константных областей тяжелой и/или легкой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй

10 пептидные линкеры происходят из константных областей субъединицы TCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры происходят из а) константных доменов субъединицы α и β TCR; или б) константных доменов субъединицы γ и δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры являются синтетическими. В некоторых вариантах

15 осуществления, первая и вторая полипептидные цепи связаны, например, посредством ковалентной связи (например, пептидной или другой химической связи) или нековалентной связи. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством а) дисульфидной связи между остатком в соединительном пептиде из первого TCRD и остатком в соединительном

20 пептиде из второго TCRD; и/или б) дисульфидной связи между остатком в первом пептидном линкере и остатком во втором пептидном линкере. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидный линкер представляет собой вариант, содержащий одну или несколько модификаций (например, замен, вставок и/или делеций аминокислот) по сравнению с последовательностью, из которой он происходит. В

25 некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры содержат одну или несколько модификаций, которые по существу не изменяют аффинность их связывания друг с другом. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры содержат одну или несколько модификаций, которые увеличивают аффинность их связывания друг с другом и/или вводят не встречающуюся в природе

30 дисульфидную связь. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид антигена-мишени/МНС содержит пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген) и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид и белок МНС, где пептид происходит из белка, выбранного из группы, состоящей

35 из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1 и PSA. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС представляет собой белок МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-A. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A представляет собой HLA-A02. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A02 представляет собой HLA-A*02:01.

40 [0158] Некоторые варианты осуществления относятся к abTCR, который специфически узнает антиген-мишень, содержащему а) первую полипептидную цепь, содержащую первый антигенсвязывающий домен, содержащий домены V_H и C_H1 антитела, и первый TCRD содержащий трансмембранный домен из цепи α TCR; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй антигенсвязывающий домен, содержащий домены V_L и C_L антитела, и второй TCRD, содержащий трансмембранный домен цепи β TCR, где домены V_H и C_H1 первого антигенсвязывающего домена и домены V_L и C_L второго антигенсвязывающего домена формируют подобный Fab антигенсвязывающий модуль,

который специфически связывает антиген-мишень, где первый TCRD и второй TCRD формируют TCRM, способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным, химерным, полусинтетическим или полностью синтетическим. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит соединительный пептид или его фрагмент из цепи α TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит соединительный пептид или его фрагмент из цепи β TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит часть внеклеточного домена из цепи α TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит часть внеклеточного домена из цепи β TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит первый внутриклеточный домен TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит второй внутриклеточный домен TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый внутриклеточный домен TCR содержит последовательность из внутриклеточного домена из цепи α TCR, и/или второй внутриклеточный домен TCR содержит последовательность из внутриклеточного домена из цепи β TCR. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий T-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или msc). В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого антигенсвязывающего домена и/или второй сигнальный пептид с amino-конца от второго антигенсвязывающего домена. В некоторых вариантах осуществления, TCRM является способным привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль выбранный из группы, состоящей из CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\gamma\epsilon$ и $\zeta\zeta$. В некоторых вариантах осуществления, TCRM способствует формированию комплекса abTCR-CD3. В некоторых вариантах осуществления, присутствует первый пептидный линкер между первым антигенсвязывающим доменом и первым TCRD и/или второй пептидный линкер между вторым антигенсвязывающим доменом и вторым TCRD. В некоторых вариантах осуществления, первая и вторая полипептидные цепи связаны, например, посредством ковалентной связи (например, пептидной или другой химической связи) или нековалентной связи. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством а) дисульфидной связи между остатком в соединительном пептиде из первого TCRD и остатком в соединительном пептиде из второго TCRD; и/или б) дисульфидной связи между остатком в домене C_H1 антитела в первом антигенсвязывающем домене и остатком в домене C_L антитела во втором антигенсвязывающем домене. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой антиген клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности выбран из группы, состоящей из белка, углевода и липида. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой ассоциированный с заболеванием антиген, такой как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой CD19, ROR1, ROR2, VCMA, GPRC5D или FCRL5. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой представленный на поверхности комплекс пептид/МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или

кодируемый вирусом антиген), и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид и белок МНС, где пептид происходит из белка, выбранного из группы, состоящей из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1 и PSA. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС представляет собой белок МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-A. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A представляет собой HLA-A02. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A02 представляет собой HLA-A*02:01.

[0159] Некоторые варианты осуществления относятся к abTCR, который специфически узнает антиген-мишень, содержащему а) первую полипептидную цепь, содержащую первый антигенсвязывающий домен, содержащий домены V_H и C_H1 антитела, и первый TCRD, содержащий трансмембранный домен из цепи β TCR; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй антигенсвязывающий домен, содержащий домены V_L и C_L антитела, и второй TCRD, содержащий трансмембранный домен из цепи α TCR, где домены V_H и C_H1 первого антигенсвязывающего домена и домены V_L и C_L второго антигенсвязывающего домена формируют подобный Fab антигенсвязывающий модуль, который специфически связывает антиген-мишень, где первый TCRD и второй TCRD формируют TCRM, способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным, химерным, полусинтетическим или полностью синтетическим. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит соединительный пептид или его фрагмент из цепи β TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит соединительный пептид или его фрагмент из цепи α TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит часть внеклеточного домена из цепи β TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит часть внеклеточного домена из цепи α TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит первый внутриклеточный домен TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит второй внутриклеточный домен TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый внутриклеточный домен TCR содержит последовательность из внутриклеточного домена из цепи β TCR, и/или второй внутриклеточный домен TCR содержит последовательность из внутриклеточного домена из цепи α TCR. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий T-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или msc). В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит первый сигнальный пептид с аминоконца от первого антигенсвязывающего домена и/или второй сигнальный пептид с аминоконца от второго антигенсвязывающего домена. В некоторых вариантах осуществления, TCRM является способным привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль выбранный из группы, состоящей из CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\gamma\epsilon$ и $\zeta\zeta$. В некоторых вариантах осуществления, TCRM способствует формированию комплекса abTCR-CD3. В некоторых вариантах осуществления, присутствует первый пептидный линкер между первым антигенсвязывающим доменом и первым TCRD и/или второй пептидный линкер между вторым антигенсвязывающим доменом и вторым TCRD. В некоторых вариантах осуществления, первая и вторая полипептидные цепи связаны, например, посредством ковалентной связи (например,

пептидной или другой химической связи) или нековалентной связи. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством а) дисульфидной связи между остатком в соединительном пептиде из первого TCRD и остатком в соединительном пептиде из второго TCRD; и/или б) дисульфидной связи между остатком в домене C_H1 антитела в первом антигенсвязывающем домене и остатком в домене C_L антитела во втором антигенсвязывающем домене. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой антиген клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности выбран из группы, состоящей из белка, углевода и липида. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой ассоциированный с заболеванием антиген, такой как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой CD19, ROR1, ROR2, VCMA, GPRC5D или FCRL5. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой представленный на поверхности комплекс пептид/МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген), и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид и белок МНС, где пептид происходит из белка, выбранного из группы, состоящей из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1 и PSA. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС представляет собой белок МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-A. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A представляет собой HLA-A02. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A02 представляет собой HLA-A*02:01.

[0160] Некоторые варианты осуществления относятся к abTCR, который специфически узнает антиген-мишень, содержащему а) первую полипептидную цепь, содержащую первый антигенсвязывающий домен, содержащий домены V_H и C_H1 антитела, и первый TCRD, содержащий трансмембранный домен из цепи γ TCR; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй антигенсвязывающий домен, содержащий домены V_L и C_L антитела, и второй TCRD, содержащий трансмембранный домен из цепи δ TCR, где домены V_H и C_H1 первого антигенсвязывающего домена и домены V_L и C_L второго антигенсвязывающего домена формируют подобный Fab антигенсвязывающий модуль, который специфически связывает антиген-мишень, где первый TCRD и второй TCRD формируют TCRM, способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным, химерным, полусинтетическим или полностью синтетическим. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит соединительный пептид или его фрагмент из цепи γ TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит соединительный пептид или его фрагмент из цепи δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит часть внеклеточного домена из цепи γ TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит часть внеклеточного домена из цепи δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит первый внутриклеточный домен TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит второй внутриклеточный домен TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый внутриклеточный домен TCR содержит последовательность из внутриклеточного

домена из цепи γ TCR, и/или второй внутриклеточный домен TCR содержит последовательность из внутриклеточного домена из цепи δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или myc). В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит первый сигнальный пептид с аминоконца от первого антигенсвязывающего домена и/или второй сигнальный пептид с аминоконца от второго антигенсвязывающего домена. В некоторых вариантах осуществления, TCRM является способным привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль выбранный из группы, состоящей из CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\zeta\epsilon$ и $\zeta\zeta$. В некоторых вариантах осуществления, TCRM способствует формированию комплекса abTCR-CD3. В некоторых вариантах осуществления, присутствует первый пептидный линкер между первым антигенсвязывающим доменом и первым TCRD и/или второй пептидный линкер между вторым антигенсвязывающим доменом и вторым TCRD. В некоторых вариантах осуществления, первая и вторая полипептидные цепи связаны, например, посредством ковалентной связи (например, пептидной или другой химической связи) или нековалентной связи. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством а) дисульфидной связи между остатком в соединительном пептиде из первого TCRD и остатком в соединительном пептиде из второго TCRD; и/или б) дисульфидной связи между остатком в домене C_{H1} антитела в первом антигенсвязывающем домене и остатком в домене C_L антитела во втором антигенсвязывающем домене. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой антиген клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности выбран из группы, состоящей из белка, углевода и липида. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой ассоциированный с заболеванием антиген, такой как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой CD19, ROR1, ROR2, VCMA, GPRC5D или FCRL5. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой представленный на поверхности комплекс пептид/МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген), и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид и белок МНС, где пептид происходит из белка, выбранного из группы, состоящей из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1 и PSA. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС представляет собой белок МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-A. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A представляет собой HLA-A02. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A02 представляет собой HLA-A*02:01.

[0161] Некоторые варианты осуществления относятся к abTCR, который специфически узнает антиген-мишень, содержащему а) первую полипептидную цепь, содержащую первый антигенсвязывающий домен, содержащий домены V_H и C_{H1} антитела, и первый TCRD, содержащий трансмембранный домен из цепи δ TCR; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй антигенсвязывающий домен, содержащий домены V_L и C_L

антитела, и второй TCRD, содержащий трансмембранный домен из цепи γ TCR, где домены V_H и C_{H1} первого антигенсвязывающего домена, и домены V_L и C_L второго антигенсвязывающего домена формируют подобный Fab антигенсвязывающий модуль, который специфически связывает антиген-мишень, где первый TCRD и второй TCRD формируют TCRM, способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным, химерным, полусинтетическим или полностью синтетическим. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит соединительный пептид или его фрагмент из цепи δ TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит соединительный пептид или его фрагмент из цепи γ TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит часть внеклеточного домена из цепи δ TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит часть внеклеточного домена из цепи γ TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит первый внутриклеточный домен TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит второй внутриклеточный домен TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый внутриклеточный домен TCR содержит последовательность из внутриклеточного домена из цепи δ TCR, и/или второй внутриклеточный домен TCR содержит последовательность из внутриклеточного домена из цепи γ TCR. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий T-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или msc). В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит первый сигнальный пептид с аминоконца от первого антигенсвязывающего домена и/или второй сигнальный пептид с аминоконца от второго антигенсвязывающего домена. В некоторых вариантах осуществления, TCRM является способным привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль, выбранный из группы, состоящей из CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\gamma\epsilon$ и $\zeta\zeta$. В некоторых вариантах осуществления, TCRM способствует формированию комплекса abTCR-CD3. В некоторых вариантах осуществления, присутствует первый пептидный линкер между первым антигенсвязывающим доменом и первым TCRD и/или второй пептидный линкер между вторым антигенсвязывающим доменом и вторым TCRD. В некоторых вариантах осуществления, первая и вторая полипептидные цепи связаны, например, посредством ковалентной связи (например, пептидной или другой химической связи) или нековалентной связи. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством а) дисульфидной связи между остатком в соединительном пептиде из первого TCRD и остатком в соединительном пептиде из второго TCRD; и/или б) дисульфидной связи между остатком в домене C_{H1} антитела в первом антигенсвязывающем домене и остатком в домене C_L антитела во втором антигенсвязывающем домене. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой антиген клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности выбран из группы, состоящей из белка, углевода и липида. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой ассоциированный с заболеванием антиген, такой как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой CD19, ROR1, ROR2,

BCMA, GPRC5D, или FCRL5. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой представленный на поверхности комплекс пептид/МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген), и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид и белок МНС, где пептид происходит из белка, выбранного из группы, состоящей из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1 и PSA. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС представляет собой белок МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-A. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A представляет собой HLA-A02. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A02 представляет собой HLA-A*02:01.

[0162] Некоторые варианты осуществления относятся к abTCR, который специфически узнает антиген-мишень, содержащему а) первую полипептидную цепь, содержащую первый антигенсвязывающий домен, содержащий домены V_H и C_H1 антитела и первый TCRD, содержащий трансмембранный домен, содержащий (например, состоящий из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 1-4; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй антигенсвязывающий домен, содержащий домены V_L и C_L антитела, и второй TCRD, содержащий трансмембранный домен, содержащий (например, состоящий из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 1-4, где домены V_H и C_H1 первого антигенсвязывающего домена и домены V_L и C_L второго антигенсвязывающего домена формируют подобный Fab антигенсвязывающий модуль, который специфически связывает антиген-мишень, где первый TCRD и второй TCRD формируют TCRM, способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным, химерным, полусинтетическим или полностью синтетическим. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит первый соединительный пептид или его фрагмент из первой субъединицы TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит второй соединительный пептид или его фрагмент из второй субъединицы TCR, где первый и/или второй соединительные пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 5-12. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит первый внутриклеточный домен TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит второй внутриклеточный домен TCR, где первый и/или второй внутриклеточные домены TCR содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 13-14. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий а) по меньшей мере одну Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность, содержащую (например, состоящий из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 70 или 71; и/или б) эпитоп-метку, содержащую (например, состоящий из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого антигенсвязывающего домена и/или второй сигнальный пептид с amino-конца от второго антигенсвязывающего домена, где первый и/или второй сигнальные пептиды содержат аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, TCRM

является способным привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль выбранный из группы, состоящей из CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\zeta\eta$ и $\zeta\zeta$. В некоторых вариантах осуществления, TCRM способствует формированию комплекса abTCR-CD3. В некоторых вариантах осуществления, присутствует первый пептидный линкер между первым антигенсвязывающим доменом и первым TCRD и/или второй пептидный линкер между вторым антигенсвязывающим доменом и вторым TCRD. В некоторых вариантах осуществления, первая и вторая полипептидные цепи связаны, например, посредством ковалентной связи (например, пептидной или другой химической связи) или нековалентной связи. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством а) дисульфидной связи между остатком в соединительном пептиде из первого TCRD и остатком в соединительном пептиде из второго TCRD; и/или б) дисульфидной связи между остатком в домене C_H1 антитела в первом антигенсвязывающем домене и остатком в домене C_L антитела во втором антигенсвязывающем домене. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой антиген клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности выбран из группы, состоящей из белка, углевода и липида. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой ассоциированный с заболеванием антиген, такой как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой CD19, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D или FCRL5. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой представленный на поверхности комплекс пептид/МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген) и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид и белок МНС, где пептид происходит из белка, выбранного из группы, состоящей из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1 и PSA. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС представляет собой белок МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-A. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A представляет собой HLA-A02. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A02 представляет собой HLA-A*02:01.

[0163] Некоторые варианты осуществления относятся к abTCR, который специфически узнает антиген-мишень, содержащему а) первую полипептидную цепь, содержащую первый антигенсвязывающий домен, содержащий домен V_H антитела, и первый TCRD содержащий трансмембранный домен, содержащий (например, состоящий из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 1-4; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй антигенсвязывающий домен, содержащий домен V_L антитела, и второй TCRD, содержащий трансмембранный домен, содержащий (например, состоящий из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 1-4, где домен V_H первого антигенсвязывающего домена и домен V_L второго антигенсвязывающего домена формируют подобный Fv антигенсвязывающий модуль, который специфически связывает антиген-мишень, где первый TCRD и второй TCRD формируют TCRM, способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль, и где антиген-мишень представляет собой комплекс пептид/МНС. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fv антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным, химерным, полусинтетическим или

полностью синтетическим. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит первый соединительный пептид или его фрагмент первой субъединицы TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит второй соединительный пептид или его фрагмент второй субъединицы TCR, где первый и/или второй соединительные пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 5-12. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит первый внутриклеточный домен TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит второй внутриклеточный домен TCR, где первый и/или второй внутриклеточные домены TCR содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 13-14. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий а) по меньшей мере одну T-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность, содержащую (например, состоящую из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 70 или 71; и/или б) эпитоп-метку, содержащую (например, состоящую из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого антигенсвязывающего домена и/или второй сигнальный пептид с amino-конца от второго антигенсвязывающего домена, где первый и/или второй сигнальный пептиды содержат аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, TCRM является способным привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль, выбранный из группы, состоящей из CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\gamma\epsilon$ и $\zeta\zeta$. В некоторых вариантах осуществления, TCRM способствует формированию комплекса abTCR-CD3. В некоторых вариантах осуществления, присутствует первый пептидный линкер между первым антигенсвязывающим доменом и первым TCRD и/или второй пептидный линкер между вторым антигенсвязывающим доменом и вторым TCRD. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй пептидные линкеры способны связываться друг с другом. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры происходят из константных областей тяжелой и/или легкой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры происходят из константных областей субъединицы TCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры происходят из а) константных доменов субъединицы α и β TCR; или б) константных доменов субъединицы γ и δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры являются синтетическими. В некоторых вариантах осуществления, первая и вторая полипептидные цепи связаны, например, посредством ковалентной связи (например, пептидной или другой химической связи) или нековалентной связи. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством а) дисульфидной связи между остатком в соединительном пептиде из первого TCRD и остатком в соединительном пептиде из второго TCRD; и/или б) дисульфидной связи между остатком в первом пептидном линкере и остатком во втором пептидном линкере. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидный линкер представляет собой вариант, содержащий одну или несколько модификаций (например, замен, вставок и/или делеций аминокислот) по сравнению с последовательностью, из которой он происходит. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры содержат одну или несколько модификаций, которые по существу не изменяют аффинность их

связывания друг с другом. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры содержат одну или несколько модификаций, которые увеличивают аффинность их связывания друг с другом и/или вводят не встречающуюся в природе дисульфидную связь. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид антигена-мишени/МНС содержит пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген), и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид и белок МНС, где пептид происходит из белка, выбранного из группы, состоящей из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1 и PSA. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС представляет собой белок МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-A. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A представляет собой HLA-A02. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A02 представляет собой HLA-A*02:01.

[0164] Некоторые варианты осуществления относятся к абTCR, который специфически узнает антиген-мишень, содержащему а) первую полипептидную цепь, содержащую, в порядке от amino-конца до карбокси-конца, первый антигенсвязывающий домен, содержащий домены V_H и C_H1 антитела, и первый TCRD, содержащий соединительный пептид, содержащий (например, состоящий из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 5-12, и трансмембранный домен, содержащий (например, состоящий из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 1-4; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую, в порядке от amino-конца до карбокси-конца, второй антигенсвязывающий домен, содержащий домены V_L и C_L антитела, и второй TCRD, содержащий соединительный пептид, содержащий (например, состоящий из) аминокислотной последовательности из любой из SEQ ID NO: 5-12, и трансмембранный домен, содержащий (например, состоящий из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 1-4; где домены V_H и C_H1 первого антигенсвязывающего домена и домены V_L и C_L второго антигенсвязывающего домена формируют подобный Fab антигенсвязывающий модуль, который специфически связывает антиген-мишень, где первый TCRD и второй TCRD формируют TCRM, способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным, химерным, полусинтетическим или полностью синтетическим. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит первый внутриклеточный домен TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит второй внутриклеточный домен TCR, где первый и/или второй внутриклеточные домены TCR содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 13-14. В некоторых вариантах осуществления, абTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий по меньшей мере одну Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность, содержащую (например, состоящий из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 70 или 71; и/или б) эпитоп-метку, содержащую (например, состоящую из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, абTCR дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого антигенсвязывающего домена и/или второй сигнальный пептид с amino-конца от второго антигенсвязывающего домена, где первый и/или второй сигнальный пептиды содержат аминокислотную последовательность из SEQ

ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, TCRM является способным привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль выбранный из группы, состоящей из CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\zeta\epsilon$ и $\zeta\zeta$. В некоторых вариантах осуществления, TCRM способствует формированию комплекса abTCR-CD3. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством а) дисульфидной связи между остатком в соединительном пептиде из первого TCRD и остатком в соединительном пептиде из второго TCRD; и/или б) дисульфидной связи между остатком в домене C_H1 антитела в первом антигенсвязывающем домене и остатком в домене C_L антитела во втором антигенсвязывающем домене. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой антиген клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности выбран из группы, состоящей из белка, углевода и липида. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой ассоциированный с заболеванием антиген, такой как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой CD19, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D или FCRL5. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой представленный на поверхности комплекс пептид/МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген), и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид и белок МНС, где пептид происходит из белка, выбранного из группы, состоящей из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1 и PSA. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС представляет собой белок МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-A. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A представляет собой HLA-A02. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A02 представляет собой HLA-A*02:01.

[0165] Некоторые варианты осуществления относятся к abTCR, который специфически узнает антиген-мишень, содержащему а) первую полипептидную цепь, содержащую, в порядке от amino-конца до карбокси-конца, первый антигенсвязывающий домен, содержащий домен V_H антитела, и первый TCRD, содержащий соединительный пептид, содержащий (например, состоящий из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 5-12, и трансмембранный домен, содержащий (например, состоящий из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 1-4; и б) вторую полипептидную цепь содержащую, в порядке от amino-конца до карбокси-конца, второй антигенсвязывающий домен, содержащий домен V_L антитела, и второй TCRD, содержащий соединительный пептид, содержащий (например, состоящий из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 5-12, и трансмембранный домен, содержащий (например, состоящий из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 1-4, где домен V_H первого антигенсвязывающего домена и домен V_L второго антигенсвязывающего домена формируют подобный Fv антигенсвязывающий модуль, который специфически связывает антиген-мишень, где первый TCRD и второй TCRD формируют TCRM, способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль, и где антиген-мишень представляет собой комплекс пептид/МНС. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fv антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным,

химерным, полусинтетическим или полностью синтетическим. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит первый соединительный пептид или его фрагмент из первой субъединицы TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит второй соединительный пептид или его фрагмент из второй субъединицы TCR, где первый и/или второй соединительные пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 5-12. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит первый внутриклеточный домен TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит второй внутриклеточный домен TCR, где первый и/или второй внутриклеточные домены TCR содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 13-14. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий а) по меньшей мере одну Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность, содержащую (например, состоящий из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 70 или 71; и/или б) эпитоп-метку, содержащую (например, состоящую из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого антигенсвязывающего домена и/или второй сигнальный пептид с amino-конца от второго антигенсвязывающего домена, где первый и/или второй сигнальные пептиды содержат аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, TCRM является способным привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль выбранный из группы, состоящей из CD3 δ е, CD3 ζ е и ζ з. В некоторых вариантах осуществления, TCRM способствует формированию комплекса abTCR-CD3. В некоторых вариантах осуществления, присутствует первый пептидный линкер между первым антигенсвязывающим доменом и первым TCRD и/или второй пептидный линкер между вторым антигенсвязывающим доменом и вторым TCRD. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй пептидные линкеры способны связываться друг с другом. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры происходят из константных областей тяжелой и/или легкой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры происходят из константных областей субъединицы TCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры происходят из а) константных доменов субъединицы α и β TCR; или б) константных доменов субъединицы γ и δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры являются синтетическими. В некоторых вариантах осуществления, первая и вторая полипептидные цепи связаны, например, посредством ковалентной связи (например, пептидной или другой химической связи) или нековалентной связи. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством а) дисульфидной связи между остатком в соединительном пептиде из первого TCRD и остатком в соединительном пептиде из второго TCRD; и/или б) дисульфидной связи между остатком в первом пептидном линкере и остатком во втором пептидном линкере. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидный линкер представляет собой вариант, содержащий одну или несколько модификаций (например, замен, вставок и/или делеций аминокислот) по сравнению с последовательностью, из которой он происходит. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры содержат одну или несколько модификаций, которые по существу не изменяют аффинность их

связывания друг с другом. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры содержат одну или несколько модификаций, которые увеличивают аффинность их связывания друг с другом и/или вводят не встречающуюся в природе дисульфидную связь. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид антигена-мишени/МНС содержит пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген), и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид и белок МНС, где пептид происходит из белка, выбранного из группы, состоящей из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1 и PSA. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС представляет собой белок МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-A. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A представляет собой HLA-A02. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A02 представляет собой HLA-A*02:01.

[0166] Некоторые варианты осуществления относятся к abTCR, который специфически узнает антиген-мишень, содержащему а) первую полипептидную цепь, содержащую, в порядке от amino-конца до карбокси-конца, первый антигенсвязывающий домен и первый TCRD, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 15; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую, в порядке от amino-конца до карбокси-конца, второй антигенсвязывающий домен и второй TCRD, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 16; где первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен формируют подобный Fab антигенсвязывающий модуль, который специфически связывает антиген-мишень, где первый TCRD и второй TCRD формируют TCRM, способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным, химерным, полусинтетическим или полностью синтетическим. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий а) по меньшей мере одну T-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность, содержащую (например, состоящую из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 70 или 71; и/или б) эпитоп-метку, содержащую (например, состоящую из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого антигенсвязывающего домена и/или второй сигнальный пептид с amino-конца от второго антигенсвязывающего домена, где первый и/или второй сигнальный пептиды содержат аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, TCRM является способным привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль выбранный из группы, состоящей из CD3δε, CD3γε и ζζ. В некоторых вариантах осуществления, TCRM способствует формированию комплекса abTCR-CD3. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством а) дисульфидной связи между остатком в соединительном пептиде из первого TCRD и остатком в соединительном пептиде из второго TCRD; и/или б) дисульфидной связи между остатками в доменах C_H1 и C_L антитела в подобном Fab антигенсвязывающем модуле. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой антиген клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности выбран из группы, состоящей из белка, углевода и липида. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной

поверхности представляет собой ассоциированный с заболеванием антиген, такой как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой CD19, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D или FCRL5. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой представленный на поверхности комплекс пептид/МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген), и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид и белок МНС, где пептид происходит из белка, выбранного из группы, состоящей из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1 и PSA. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС представляет собой белок МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-A. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A представляет собой HLA-A02. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A02 представляет собой HLA-A*02:01.

[0167] Некоторые варианты осуществления относятся к abTCR, который специфически узнает антиген-мишень, содержащему а) первую полипептидную цепь, содержащую, в порядке от amino-конца до карбокси-конца, первый антигенсвязывающий домен и первый TCRD, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 17; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую, в порядке от amino-конца до карбокси-конца, второй антигенсвязывающий домен и второй TCRD, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 18; где первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен формируют подобный Fab антигенсвязывающий модуль, который специфически связывает антиген-мишень, где первый TCRD и второй TCRD формируют TCRM, способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным, химерным, полусинтетическим или полностью синтетическим. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий а) по меньшей мере одну T-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность, содержащую (например, состоящую из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 70 или 71; и/или б) эпитоп-метку, содержащую (например, состоящую из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого антигенсвязывающего домена и/или второй сигнальный пептид с amino-конца от второго антигенсвязывающего домена, где первый и/или второй сигнальный пептиды содержат аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, TCRM является способным привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль, выбранный из группы, состоящей из CD3 δ , CD3 γ и ζ . В некоторых вариантах осуществления, TCRM способствует формированию комплекса abTCR-CD3. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством а) дисульфидной связи между остатком в соединительном пептиде из первого TCRD и остатком в соединительном пептиде из второго TCRD; и/или б) дисульфидной связи между остатками в доменах C_H1 и C_L антитела в подобном Fab антигенсвязывающем модуле. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой антиген клеточной поверхности. В некоторых вариантах

осуществления, антиген клеточной поверхности выбран из группы, состоящей из белка, углевода и липида. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой ассоциированный с заболеванием антиген, такой как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой CD19, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D или FCRL5. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой представленный на поверхности комплекс пептид/МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген), и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид и белок МНС, где пептид происходит из белка, выбранного из группы, состоящей из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1 и PSA. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС представляет собой белок МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-A. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A представляет собой HLA-A02. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A02 представляет собой HLA-A*02:01.

[0168] Некоторые варианты осуществления относятся к abTCR, который специфически узнает антиген-мишень, содержащему а) первую полипептидную цепь, содержащую, в порядке от amino-конца до карбокси-конца, первый антигенсвязывающий домен и первый TCRD, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 19; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую, в порядке от amino-конца до карбокси-конца, второй антигенсвязывающий домен и второй TCRD, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 20; где первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен формируют подобный Fab антигенсвязывающий модуль, который специфически связывает антиген-мишень, где первый TCRD и второй TCRD формируют TCRM, способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным, химерным, полусинтетическим или полностью синтетическим. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий а) по меньшей мере одну Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность, содержащую (например, состоящую из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 70 или 71; и/или б) эпитоп-метку, содержащую (например, состоящую из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого антигенсвязывающего домена и/или второй сигнальный пептид с amino-конца от второго антигенсвязывающего домена, где первый и/или второй сигнальный пептиды содержат аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, TCRM является способным привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль выбранный из группы, состоящей из CD3 δ , CD3 γ и ζ . В некоторых вариантах осуществления, TCRM способствует формированию комплекса abTCR-CD3. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством а) дисульфидной связи между остатком в соединительном пептиде из первого TCRD и остатком в соединительном пептиде из второго TCRD; и/или б) дисульфидной связью между остатками в доменах C_H1 и C_L антитела в подобном Fab

антигенсвязывающем модуле. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой антиген клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности выбран из группы, состоящей из белка, углевода и липида. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой ассоциированный с заболеванием антиген, такой как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой CD19, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D или FCRL5. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой представленный на поверхности комплекс пептид/МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген), и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид и белок МНС, где пептид происходит из белка, выбранного из группы, состоящей из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1 и PSA. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС представляет собой белок МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-A. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A представляет собой HLA-A02. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A02 представляет собой HLA-A*02:01.

[0169] Некоторые варианты осуществления относятся к abTCR, который специфически узнает антиген-мишень, содержащему а) первую полипептидную цепь, содержащую, в порядке от amino-конца до карбокси-конца, первый антигенсвязывающий домен и первый TCRD, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 21; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую, в порядке от amino-конца до карбокси-конца, второй антигенсвязывающий домен и второй TCRD, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 22; где первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен формируют подобный Fab антигенсвязывающий модуль, который специфически связывает антиген-мишень, где первый TCRD и второй TCRD формируют TCRM, способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным, химерным, полусинтетическим или полностью синтетическим. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий а) по меньшей мере одну Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность, содержащую (например, состоящую из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 70 или 71; и/или б) эпитоп-метку, содержащую (например, состоящую из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого антигенсвязывающего домена и/или второй сигнальный пептид с amino-конца от второго антигенсвязывающего домена, где первый и/или второй сигнальный пептиды содержат аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, TCRM является способным привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль выбранный из группы, состоящей из CD3δε, CD3γε и ζζ. В некоторых вариантах осуществления, TCRM способствует формированию комплекса abTCR-CD3. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством а) дисульфидной связи между остатком в соединительном пептиде из

первого TCRD и остатком в соединительном пептиде из второго TCRD; и/или б) дисульфидной связи между остатками в доменах C_H1 и C_L антитела в подобном Fab антигенсвязывающем модуле. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой антиген клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности выбран из группы, состоящей из белка, углевода и липида. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой ассоциированный с заболеванием антиген, такой как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой CD19, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D или FCRL5. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой представленный на поверхности комплекс пептид/МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген), и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид и белок МНС, где пептид происходит из белка, выбранного из группы, состоящей из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1 и PSA. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС представляет собой белок МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-A. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A представляет собой HLA-A02. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A02 представляет собой HLA-A*02:01.

[0170] Некоторые варианты осуществления относятся к абTCR, который специфически узнает комплекс, содержащий пептид AFP и белок МНС I, содержащему а) первую полипептидную цепь, содержащую первый домен абTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 23; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй домен абTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством одной или нескольких дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления, абTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или мус). В некоторых вариантах осуществления, эпитоп-метка содержит любой из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с амино-конца от первого домена абTCR и/или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с амино-конца от второго домена абTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49.

[0171] Некоторые варианты осуществления относятся к абTCR, который специфически узнает комплекс, содержащий пептид AFP и белок МНС I, содержащему а) первую полипептидную цепь, содержащую первый домен абTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 25; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй домен абTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством одной или нескольких дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления, абTCR дополнительно содержит по меньшей

мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или мус). В некоторых вариантах осуществления, эпитоп-метка содержит любую из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого домена abTCR, и/или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с amino-конца от второго домена abTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49.

[0172] Некоторые варианты осуществления относятся к abTCR, который специфически узнает комплекс, содержащий пептид AFP и белок MHC I, содержащему а) первую полипептидную цепь, содержащую первый домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 27; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством одной или нескольких дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или мус). В некоторых вариантах осуществления, эпитоп-метка содержит любую из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого домена abTCR, и/или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с amino-конца от второго домена abTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49.

[0173] Некоторые варианты осуществления относятся к abTCR, который специфически узнает комплекс, содержащий пептид AFP и белок MHC I, содержащему а) первую полипептидную цепь, содержащую первый домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 29; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 30. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством одной или нескольких дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или мус). В некоторых вариантах осуществления, эпитоп-метка содержит любую из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого домена abTCR, и/или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с amino-конца от второго домена abTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из SEQ

ID NO: 49.

[0174] Некоторые варианты осуществления относятся к abTCR, который специфически узнает комплекс, содержащий пептид AFP и белок МНС I, содержащему а) первую полипептидную цепь, содержащую первый домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 31; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством одной или нескольких дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или msc). В некоторых вариантах осуществления, эпитоп-метка содержит любую из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого домена abTCR, и/или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с amino-конца от второго домена abTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49.

[0175] Некоторые варианты осуществления относятся к abTCR, который специфически узнает комплекс, содержащий пептид AFP и белок МНС I, содержащему а) первую полипептидную цепь, содержащую первый домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 33; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством одной или нескольких дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG, или msc). В некоторых вариантах осуществления, эпитоп-метка содержит любую из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого домена abTCR, и/или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с amino-конца от второго домена abTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49.

[0176] Некоторые варианты осуществления относятся к abTCR, который специфически узнает комплекс, содержащий пептид AFP и белок МНС I, содержащему а) первую полипептидную цепь, содержащую первый домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 35; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством одной или нескольких дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий Т-клеточную

костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG, или msc). В некоторых вариантах осуществления, эпитоп-метка содержит любую из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого домена abTCR, и/или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с amino-конца от второго домена abTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49.

[0177] Некоторые варианты осуществления относятся к abTCR, который специфически узнает комплекс, содержащий пептид AFP и белок MHC I, содержащему антигенсвязывающий модуль, содержащий домен V_H антитела, содержащий (и в некоторых вариантах осуществления, состоящий из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 38, или его вариант, имеющий по меньшей мере приблизительно 95% (например, по меньшей мере приблизительно любой из 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности последовательности, и домен V_L антитела, содержащий (и в некоторых вариантах осуществления состоящий из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 40, или ее вариант, имеющий по меньшей мере приблизительно 95% (например, по меньшей мере приблизительно любой из 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности последовательности.

[0178] Таким образом, некоторые варианты осуществления относятся к abTCR, который специфически узнает комплекс, содержащий пептид AFP и белок MHC I в соответствии с любым из abTCR, описанным выше, где домен V_H антитела из подобного Fab антигенсвязывающего модуля заменен на последовательность, содержащую (и в некоторых вариантах осуществления, состоящую из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 38, или ее вариант, имеющий по меньшей мере приблизительно 95% (например, по меньшей мере приблизительно любой из 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности последовательности, и где домен V_L антитела из подобного Fab антигенсвязывающего модуля заменен на последовательность, содержащую (и в некоторых вариантах осуществления, состоящую из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 40, или ее вариант, имеющий по меньшей мере приблизительно 95% (например, по меньшей мере приблизительно любой из 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности последовательности.

[0179] Некоторые варианты осуществления относятся к abTCR, который специфически узнает CD19, содержащему а) первую полипептидную цепь, содержащую первый домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 42; и b) вторую полипептидную цепь, содержащую второй домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством одной или нескольких дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий T-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или msc). В некоторых вариантах осуществления, эпитоп-метка содержит любую из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная

цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого домена abTCR, и/или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с amino-конца от второго домена abTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49.

[0180] Некоторые варианты осуществления относятся к abTCR, который специфически узнает CD19, содержащему а) первую полипептидную цепь, содержащую первый домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 42; и b) вторую полипептидную цепь, содержащую второй домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством одной или нескольких дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий T-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или msc). В некоторых вариантах осуществления, эпитоп-метка содержит любую из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого домена abTCR, и/или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с amino-конца от второго домена abTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49.

[0181] Некоторые варианты осуществления относятся к abTCR, который специфически узнает CD19, содержащему а) первую полипептидную цепь, содержащую первый домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 55; и b) вторую полипептидную цепь, содержащую второй домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством одной или нескольких дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий T-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или msc). В некоторых вариантах осуществления, эпитоп-метка содержит любую из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого домена abTCR, и/или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с amino-конца от второго домена abTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49.

[0182] Некоторые варианты осуществления относятся к abTCR, который специфически узнает CD19, содержащему а) первую полипептидную цепь, содержащую первый домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 56; и b) вторую полипептидную цепь, содержащую второй домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством одной или нескольких дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления, abTCR

дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или мус). В некоторых вариантах осуществления, эпитоп-метка содержит любую из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого домена abTCR, и/или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с amino-конца от второго домена abTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49.

[0183] Некоторые варианты осуществления относятся к abTCR в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, который специфически узнает CD19, содержащему антигенсвязывающий модуль, содержащий домен V_H антитела, содержащий (и в некоторых вариантах осуществления состоящий из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 45, или ее вариант, имеющий по меньшей мере приблизительно 95% (например, по меньшей мере приблизительно любое из 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности последовательности, и домен V_L антитела, содержащий (и в некоторых вариантах осуществления состоящий из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 46, или ее вариант, имеющий по меньшей мере приблизительно 95% (например, по меньшей мере приблизительно любое из 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности последовательности.

[0184] Некоторые варианты осуществления относятся к abTCR в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, который специфически узнает CD19, содержащему антигенсвязывающий модуль, содержащий домен V_H антитела, содержащий (и в некоторых вариантах осуществления состоящий из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 45, или ее вариант, имеющий по меньшей мере приблизительно 95% (например, по меньшей мере приблизительно любой из 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности последовательности, и домен V_L антитела, содержащий (и в некоторых вариантах осуществления состоящий из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 57, или ее вариант, имеющий по меньшей мере приблизительно 95% (например, по меньшей мере приблизительно любой из 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности последовательности.

[0185] Некоторые варианты осуществления относятся к abTCR в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, который специфически узнает CD19, содержащему антигенсвязывающий модуль, содержащий домен V_H антитела, содержащий (и в некоторых вариантах осуществления состоящий из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 58, или ее вариант, имеющий по меньшей мере приблизительно 95% (например, по меньшей мере приблизительно любой из 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности последовательности, и домен V_L антитела, содержащий (и в некоторых вариантах осуществления состоящий из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 57, или ее вариант, имеющий по меньшей мере приблизительно 95% (например, по меньшей мере приблизительно любой из 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности последовательности.

[0186] Некоторые варианты осуществления относятся к abTCR в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, который специфически узнает CD19, содержащему антигенсвязывающий модуль, содержащий

домен V_H антитела, содержащий (и в некоторых вариантах осуществления состоящий из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 59, или ее вариант, имеющий по меньшей мере приблизительно 95% (например, по меньшей мере приблизительно любой из 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности последовательности, и домен V_L

антитела, содержащий (и в некоторых вариантах осуществления состоящий из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 57, или ее вариант, имеющий по меньшей мере приблизительно 95% (например, по меньшей мере приблизительно любой из 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности последовательности.

[0187] Некоторые варианты осуществления относятся к абTCR в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, который специфически узнает комплекс, содержащий пептид 157-165 NY-ESO-1 и белок MHC I, содержащему антигенсвязывающий модуль, содержащий домен V_H антитела,

содержащий (и в некоторых вариантах осуществления состоящий из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 72, или ее вариант, имеющий по меньшей мере приблизительно 95% (например, по меньшей мере приблизительно любой из 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности последовательности, и домен V_L антитела, содержащий (и

в некоторых вариантах осуществления состоящий из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 73, или ее вариант, имеющий по меньшей мере приблизительно 95% (например, по меньшей мере приблизительно любой из 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности последовательности.

[0188] Некоторые варианты осуществления относятся к абTCR, содержащему первый антигенсвязывающий модуль, конкурирующий за связывание с антигеном-мишенью с вторым антигенсвязывающим модулем в соответствии с любым из абTCR, описанных

в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, первый антигенсвязывающий модуль связывается с таким же, или по существу с таким же, эпитопом, что и второй антигенсвязывающий модуль. В некоторых вариантах

осуществления, связывание первого антигенсвязывающего модуля с антигеном-мишенью ингибирует связывание второго антигенсвязывающего модуля с антигеном-мишенью по меньшей мере приблизительно на 70% (например, по меньшей мере приблизительно на любой из 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%), или наоборот. В некоторых

вариантах осуществления, первый антигенсвязывающий модуль и второй антигенсвязывающий модуль проявляют перекрестную конкуренцию за связывание с антигеном-мишенью, т.е., каждый из первого и второго антигенсвязывающих модулей конкурирует с другим за связывание с антигеном-мишенью.

[0189] Некоторые варианты осуществления относятся к абTCR в соответствии с любым из абTCR, описанных в настоящем описании, где домены V_L и V_H заменены местами, так что первый антигенсвязывающий домен содержит домены V_L и C_H1 антитела, и второй антигенсвязывающий домен содержит домены V_H и C_L антитела.

[0190] Некоторые варианты осуществления относятся к комплексу, содержащий абTCR в соответствии с любым из абTCR, описанных в настоящем описании, и по меньшей мере один передающий сигналы модуль выбранный из группы, состоящей из CD3 δ ϵ , CD3 γ ϵ и ζ ζ . В некоторых вариантах осуществления, комплекс содержит каждый из CD3 δ ϵ , CD3 γ ϵ и ζ ζ . Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, представлен комплекс, содержащий абTCR, CD3 δ ϵ , CD3 γ ϵ и ζ ζ .

[0191] Различные аспекты обсуждают более подробно в различных разделах ниже. Нуклеиновые кислоты

[0192] Предусмотрены также молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие абTCR.

В некоторых вариантах осуществления, в соответствии с любым из абТСР, описанных в настоящем описании, представлена нуклеиновая кислота (или группа нуклеиновых кислот), кодирующая абТСР.

5 [0193] Настоящее изобретение также относится к векторам, в которые вставлена нуклеиновая кислота по настоящему изобретению.

[0194] В кратком обобщении, экспрессии абТСР посредством нуклеиновой кислоты, кодирующей абТСР, можно достигать посредством вставки нуклеиновой кислоты в подходящий экспрессирующий вектор, таким образом, что нуклеиновая кислота является функционально связанной с 5'- и 3'-регуляторными элементами, включая, например, промотор (например, специфический для лимфоцитов промотор) и 3'-нетранслируемую область (UTR). Векторы могут являться подходящими для репликации и интеграции в эукариотических клетках-хозяевах. Типичные векторы для клонирования и экспрессии содержат терминаторы, последовательности для инициации и промоторы для транскрипции и трансляции, которые можно использовать для регуляции экспрессии желательной последовательности нуклеиновой кислоты.

[0195] Нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению можно также использовать для иммунизации нуклеиновой кислотой и генотерапии, с использованием стандартных способов доставки генов. Способы доставки генов известны в данной области. См., например, Патенты США No. 5399346, 5580859, 5589466, полное содержание которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки. В некоторых вариантах осуществления, изобретение относится к вектору для генотерапии.

[0196] Нуклеиновую кислоту можно клонировать в несколько типов векторов. Например, нуклеиновую кислоту можно клонировать в вектор, включая, но без ограничения, плазмиду, фагмиду, производное фага, вирус животных и космиду. Представляющие особый интерес векторы включают экспрессирующие векторы, векторы для репликации, векторы для получения зондов и векторы для секвенирования.

[0197] Кроме того, экспрессирующий вектор можно предоставлять в клетке в форме вирусного вектора. Технология вирусных векторов хорошо известна в данной области и описана, например, в Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) и в других руководствах по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, которые можно использовать в качестве векторов, включают, но без ограничения, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса и лентивирусы. Как правило, пригодный вектор содержит точку начала репликации, функциональную по меньшей мере в одном организме, промоторную последовательность, удобные участки для рестрикционных эндонуклеаз и один или несколько селективных маркеров (см., например, WO 01/96584; WO 01/29058; и Патент США No. 6326193).

[0198] Ряд систем на основе вирусов разработан для переноса генов в клетки млекопитающих. Например, ретровирусы обеспечивают удобную платформу для систем доставки генов. Выбранный ген можно вставлять в вектор и упаковывать в ретровирусные частицы с использованием способов, известных в данной области. Затем рекомбинантный вирус можно выделять и доставлять в клетки субъекта либо *in vivo*, либо *ex vivo*. Ряд ретровирусных систем известны в данной области. В некоторых вариантах осуществления, используют аденовирусные векторы. Ряд аденовирусных векторов известны в данной области. В некоторых вариантах осуществления, используют лентивирусные векторы. Векторы, происходящие из ретровирусов, таких как лентивирус, являются пригодными инструментами для осуществления длительного переноса генов, поскольку они позволяют длительную, стабильную интеграцию трансгена и его

размножение в дочерних клетках. Lentивирусные векторы обладают дополнительным преимуществом по сравнению с другими векторами, происходящими из онкоретровирусов, таких как вирусы лейкоза мышей, в том, что они могут трансдуцировать непролиферирующие клетки, такие как гепатоциты. Они могут также обладать дополнительным преимуществом низкой иммуногенности.

[0199] Дополнительные промоторные элементы, например, энхансеры, регулируют частоту инициации транскрипции. Как правило, они локализованы в области на 30-110 п.о. выше стартового участка, хотя недавно показано, что ряд промоторов содержит также функциональные элементы ниже стартового участка. Промежутки между элементами промотора часто являются гибкими, так что функция промотора сохраняется, когда элементы инвертированы или сдвинуты друг относительно друга. В промоторе тимидинкиназы (tk), промежутки между элементами промотора можно увеличивать до разделения на 50 п.о. до того, как активность начнет уменьшаться.

[0200] Одним из примеров пригодного промотора является последовательность немедленного раннего промотора цитомегаловируса (CMV). Эта промоторная последовательность представляет собой сильную конститутивную промоторную последовательность, способную приводить к высоким уровням экспрессии любой полинуклеотидной последовательности, функционально связанной с ней. Другим примером пригодного промотора является промотор фактора элонгации-1 α (EF-1 α). Однако, можно использовать также другие конститутивные промоторные последовательности, включая, но без ограничения, ранний промотор вируса обезьян 40 (SV40), промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), промотор длинного концевой повтора (LTR) вируса иммунодефицита человека (HIV), промотор MoMuLV, промотор вируса лейкоза птиц, немедленный ранний промотор вируса Эпштейна-Барр, промотор вируса саркомы Рауса, также как промоторы генов человека, такие как, но без ограничения, промотор актина, промотор миозина, промотор гемоглобина и промотор креатинкиназы.

[0201] Кроме того, изобретение не следует ограничивать применением конститутивных промоторов. Индуцируемые промоторы также предусмотрены в качестве части изобретения. Применение индуцируемого промотора обеспечивает молекулярный переключатель, способный включать экспрессию полинуклеотидной последовательности, с которой он функционально связан, когда такая экспрессия является желательной, или выключать экспрессию, когда экспрессия является нежелательной. Иллюстративные индуцируемые промоторные системы для использования в эукариотических клетках включают, но без ограничения, регулируемые гормонами элементы (например, см. Mader, S. and White, J. H. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5603-5607), регулируемые синтетическими лигандами элементы (см., например, Spencer, D. M. et al 1993) Science 262: 1019-1024) и регулируемые ионизирующим излучением элементы (например, см. Manome, Y. et al. (1993) Biochemistry 32: 10607-10613; Datta, R. et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1014- 10153). Обзор дополнительных иллюстративных индуцируемых промоторных систем для использования в системах млекопитающих *in vitro* или *in vivo* приведен в Gingrich et al. (1998) Annual Rev. Neurosci 21:377-405.

[0202] Одной из иллюстративных индуцируемых промоторных систем для применения по настоящему изобретению является система Tet. Такие системы основаны на системе Tet, описанной в Gossen et al. (1993). В одном из иллюстративных вариантов осуществления, представляющий интерес полинуклеотид находится под контролем промотора, содержащего один или несколько участков оператора Tet (TetO). В

неактивном состоянии, репрессор Tet (TetR) связывается с участками TetO и репрессирует транскрипцию с промотора. В активном состоянии, например, в присутствии индуцирующего средства, такого как тетрациклин (Tc), ангидротетрациклин, доксицилин (Dox) или его активный аналог, индуцирующее средство вызывает высвобождение TetR из TetO, таким образом позволяя транскрипции иметь место. Доксицилин является членом тетрациклинового семейства антибиотиков, обладая химическим наименованием 1-диметиламино-2,4а,5,7,12-пентагидрокси-11-метил-4,6-диоксо-1,4а,11,11а,12,12а-гексагидротетрацен-3-карбоксамид.

[0203] В одном варианте осуществления, TetR подвергают оптимизации кодонного состава для экспрессии в клетках млекопитающих, например, мышинных или человеческих клетках. Большинство аминокислот кодированы более, чем одним кодоном из-за вырожденности генетического кода, что позволяет значительные изменения нуклеотидной последовательности данной нуклеиновой кислоты без какого-либо изменения аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеиновой кислотой. Однако, для многих организмов показаны различия в использовании кодонов, также известные как «сдвиг кодонного состава» (т.е., сдвиг использования конкретного кодона (кодонов) для данной аминокислоты). Сдвиг кодонного состава часто коррелирует с присутствием преобладающих видов тРНК для конкретного кодона, что в свою очередь увеличивает эффективность трансляции мРНК. Соответственно, кодирующую последовательность, происходящую из конкретного организма (например, прокариота), можно адаптировать для улучшенной экспрессии в другом организме (например, эукариоте) посредством оптимизации кодонного состава.

[0204] Другие конкретные варианты системы Tet включают следующие системы «Tet-Off» и «Tet-On». В системе Tet-Off, транскрипция является неактивной в присутствии Tc или Dox. В этой системе, контролируемый тетрациклином белок-трансактиватор (tTA), состоящий из TetR, слитого с сильным трансактивирующим доменом VP16 из вируса простого герпеса, регулирует экспрессию нуклеиновой кислоты-мишени, находящейся под контролем транскрипции отвечающего на тетрациклин промоторного элемента (TRE). TRE состоит из конкатемеров последовательности TetO, слитых с промотором (обычно, минимальной промоторной последовательностью, происходящей из немедленного раннего промотора цитомегаловируса человека (hCMV)). В отсутствие Tc или Dox, tTA связывается с TRE и активирует транскрипцию гена-мишени. В присутствии Tc или Dox, tTA не может связываться с TRE, и экспрессия с гена-мишени остается неактивной.

[0205] И наоборот, в системе Tet-On, транскрипция является активной в присутствии Tc или Dox. Система Tet-On основана на трансактиваторе с обратным контролем тетрациклином, rtTA. Подобно tTA, rtTA представляет собой слитый белок, состоящий из репрессора TetR и трансактивирующего домена VP16. Однако, четыре аминокислотные замены в ДНК-связывающей группе TetR изменяют характеристики связывания rtTA, так что он может узнавать последовательности tetO в TRE трансгена-мишени только в присутствии Dox. Таким образом, в системе Tet-On, транскрипция регулируемого TRE гена-мишени стимулируется rtTA только в присутствии Dox.

[0206] Другой индуцируемой промоторной системой является система репрессора lac из E. coli. (См., Brown et al., Cell 49:603-612 (1987)). Система репрессора lac функционирует посредством регуляции транскрипции представляющего интерес полинуклеотида, функционально связанного с промотором, содержащим оператор lac (lacO). Репрессор lac (lacR) связывается с LacO, таким образом, предотвращая транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида. Экспрессию представляющего

интерес полинуклеотида индуцируют посредством пригодного индуцирующего средства, например, изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (IPTG).

[0207] Для оценки экспрессии полипептида или его частей, экспрессирующий вектор, подлежащий введению в клетку, может также содержать либо ген селективного маркера, либо репортерный ген, или оба, для облегчения идентификации и отбора экспрессирующих клеток из популяции клеток, как считают, трансфицированных или инфицированных посредством вирусных векторов. В других аспектах, отдельный фрагмент ДНК может нести селективный маркер, и может быть использован в способе совместной трансфекции. Как гены селективных маркеров, так и репортерные гены можно фланкировать подходящими регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии в клетках-хозяевах. Селективные маркеры, которые можно использовать, включают, например, гены устойчивости к антибиотикам, такие как нео и т.п.

[0208] Репортерные гены используют для идентификации потенциально трансфицированных клеток и для оценки функциональности регуляторных последовательностей. Как правило, репортерный ген представляет собой ген, который не присутствует или не экспрессируется в организме или ткани реципиента и который кодирует полипептид, экспрессия которого проявляется некоторым легко поддающимся детекции свойством, например, ферментативной активностью. Экспрессию репортерного гена оценивают через подходящее время после того, как ДНК введена в клетки-реципиенты. Пригодные репортерные гены могут включать гены, кодирующие люциферазу, β-галактозидазу, хлорамфениколацетилтрансферазу, секретлируемую щелочную фосфатазу, или ген зеленого флуоресцентного белка (например, Ui-Tel et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82). Пригодные системы экспрессии являются хорошо известными, и их можно получать с использованием известных способов или получать коммерчески. Как правило, конструкцию с минимальной 5'-фланкирующей областью, обладающую наивысшим уровнем экспрессии репортерного гена, идентифицируют как промотор. Такие промоторные области могут быть сцеплены с репортерным геном и использованы для оценки средств по способности модулировать управляемую промотором транскрипцию.

[0209] Некоторые варианты осуществления, относятся к нуклеиновой кислоте, кодирующей abTCR в соответствии с любым из abTCR, описанных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая abTCR, содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первую полипептидную цепь abTCR, и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вторую полипептидную цепь abTCR. В некоторых вариантах осуществления, первая последовательность нуклеиновой кислоты локализована на первом векторе, и вторая последовательность нуклеиновой кислоты локализована на втором векторе. В некоторых вариантах осуществления, первая и вторая последовательности нуклеиновой кислоты локализованы на одном и том же векторе. Векторы могут являться выбранными, например, из группы, состоящей из экспрессирующих векторов и вирусных векторов для млекопитающих (таких как векторы, происходящие из ретровирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, вирусов герпеса и лентивирусов). В некоторых вариантах осуществления, первая последовательность нуклеиновой кислоты находится под контролем первого промотора, и вторая последовательность нуклеиновой кислоты находится под контролем второго промотора. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй промоторы обладают одинаковой последовательностью. В некоторых вариантах осуществления,

первый и второй промоторы обладают различными последовательностями. В некоторых вариантах осуществления, первую и вторую последовательности нуклеиновой кислоты экспрессируют в форме одного транскрипта под контролем одного промотора в мультицистронном (таком как бицистронный) векторе. См., например, Kim, JH, et al., PLoS One 6(4):e18556, 2011. В некоторых вариантах осуществления, первый, второй и/или единственный промоторы являются индуцируемыми. В некоторых вариантах осуществления, первая последовательность нуклеиновой кислоты обладает уровнем экспрессии в клетке-хозяине (такой как Т-клетка), который является приблизительно таким же, как уровень экспрессии второй последовательности нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления, первая последовательность нуклеиновой кислоты обладает уровнем экспрессии в клетке-хозяине (такой как Т-клетка), по меньшей мере приблизительно в два (например, по меньшей мере приблизительно в любое количество из 2, 3, 4, 5 или более) раза превышающим уровень экспрессии второй последовательности нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления, первая последовательность нуклеиновой кислоты обладает уровнем экспрессии в клетке-хозяине (такой как Т-клетка), составляющим не более, чем приблизительно 1/2 (например, не более, чем приблизительно любое количество из 1/2, 1/3, 1/4, 1/5 или менее) от уровня экспрессии второй последовательности нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине. Экспрессию можно определять на уровне мРНК или белка. Уровень экспрессии мРНК можно определять посредством измерения количества мРНК, транскрибированной с нуклеиновой кислоты, с использованием различных хорошо известных способов, включая Нозерн-блоттинг, количественную РТ-ПЦР, анализ микромассивов и т.п. Уровень экспрессии белка можно измерять известными способами, включая иммуноцитохимическое окрашивание, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), анализ Вестерн блоттинга, люминесцентные анализы, масс-спектрометрию, высокоэффективную жидкостную хроматографию, жидкостную хроматографию высокого давления-тандемную масс-спектрометрию и т.п.

[0210] Таким образом, некоторые варианты осуществления относятся к нуклеиновой кислоте, кодирующей abTCR в соответствии с любым из abTCR, описанных в настоящем описании, содержащей а) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первую полипептидную цепь abTCR, и б) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вторую полипептидную цепь abTCR, где первая последовательность нуклеиновой кислоты локализована на первом векторе (таком как лентивирусный вектор) и функционально связана с первым промотором, и вторая последовательность нуклеиновой кислоты локализована на втором векторе (таком как лентивирусный вектор) и функционально связана с вторым промотором. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй промоторы обладают одинаковой последовательностью. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй промоторы обладают различными последовательностями. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй промоторы являются индуцируемыми. В некоторых вариантах осуществления, первая последовательность нуклеиновой кислоты обладает уровнем экспрессии в клетке-хозяине (такой как Т-клетка), который является приблизительно таким же, как уровень экспрессии второй последовательности нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления, первая последовательность нуклеиновой кислоты обладает уровнем экспрессии в клетке-хозяине (такой как Т-клетка), по меньшей мере приблизительно в два (например, по меньшей мере приблизительно в любое количество из 2, 3, 4, 5 или более) раза

превышающим уровень экспрессии второй последовательности нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления, первая последовательность нуклеиновой кислоты обладает уровнем экспрессии в клетке-хозяине (такой как Т-клетка), составляющим не более, чем приблизительно 1/2 (например, не более, чем

5 приблизительно любое количество из 1/2, 1/3, 1/4, 1/5 или менее) от уровня экспрессии второй последовательности нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй векторы представляют собой вирусные векторы (такие как лентивирусные векторы).

[0211] Некоторые варианты осуществления относятся к вектору (такому как

10 лентивирусный вектор), содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую абTCR в соответствии с любым из абTCR, описанных в настоящем описании, содержащую а) первый промотор, функционально связанный с первой последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей первую полипептидную цепь абTCR; и b) второй промотор, функционально связанный с второй последовательностью нуклеиновой

15 кислоты, кодирующей вторую полипептидную цепь абTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй промоторы обладают одинаковой последовательностью. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй промоторы обладают различными последовательностями. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй промоторы являются индуцируемыми. В некоторых

20 вариантах осуществления, первая последовательность нуклеиновой кислоты обладает уровнем экспрессии в клетке-хозяине (такой как Т-клетка), который является приблизительно таким же, как уровень экспрессии второй последовательности нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления, первая последовательность нуклеиновой кислоты обладает уровнем экспрессии в клетке-

25 хозяине (такой как Т-клетка), по меньшей мере приблизительно в два (например, по меньшей мере приблизительно в любое количество из 2, 3, 4, 5 или более) раза превышающим уровень экспрессии второй последовательности нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления, первая последовательность нуклеиновой кислоты обладает уровнем экспрессии в клетке-хозяине (такой как Т-

30 клетка), составляющим не более, чем приблизительно 1/2 (например, не более, чем приблизительно любое количество из 1/2, 1/3, 1/4, 1/5 или менее) от уровня экспрессии второй последовательности нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления, вектор представляет собой вирусный вектор (такой как лентивирусный вектор).

35 [0212] Некоторые варианты осуществления относятся к вектору (такой как лентивирусный вектор), содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую абTCR в соответствии с любым из абTCR, описанных в настоящем описании, содержащему а) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первую полипептидную цепь абTCR; и b) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую

40 вторую полипептидную цепь абTCR; где первая и вторая последовательности нуклеиновой кислоты находятся под контролем одного промотора. В некоторых вариантах осуществления, промотор является функционально связанным с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты, выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы

45 (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2A (такой как P2A, T2A, E2A или F2A), связывающий 3'-конец первой последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность

нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, промотор является функционально связанным с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2А (такой как Р2А, Т2А, Е2А или F2А), связывающий 3'-конец второй последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, промотор является индуцируемым. В некоторых вариантах осуществления, вектор представляет собой вирусный вектор (такой как лентивирусный вектор).

[0213] Способы введения в клетку и экспрессии генов в клетке известны в данной области. В контексте экспрессирующего вектора, вектор можно легко вводить в клетку-хозяина, например, в клетку млекопитающего, бактерии, дрожжей или насекомого, любым способом из данной области. Например, экспрессирующий вектор можно переносить в клетку-хозяина посредством физических, химических или биологических способов.

[0214] Физические способы введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают преципитацию фосфатом кальция, липофекцию, бомбардировку частицами, микроинъекцию, электропорацию и т.п. Способы получения клеток, содержащих векторы и/или экзогенные нуклеиновые кислоты, хорошо известны в данной области. См., например, Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York). В некоторых вариантах осуществления, введение полинуклеотида в клетку-хозяина проводят посредством трансфекции с фосфатом кальция.

[0215] Биологические способы введения представляющего интерес полинуклеотида в клетку-хозяина включают использование ДНК- и РНК-векторов. Вирусные векторы, и особенно ретровирусные векторы, стали представлять наиболее широко используемый способ вставки генов в клетки млекопитающего, например, человека. Другие вирусные векторы могут происходить из лентивируса, поксвирусов, вируса простого герпеса 1, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов, и т.п. См., например, Патенты США No. 5350674 и 5585362.

[0216] Химические средства для введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают коллоидные дисперсные системы, такие как макромолекулярные комплексы, нанокапсулы, микросферы, бусины и системы на основе липидов, включая эмульсии масло-в-воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Иллюстративной коллоидной системой для использования в качестве носителя для доставки *in vitro* и *in vivo*, является липосома (например, пузырек с искусственной мембраной).

[0217] В случае, когда используют невирусную систему доставки, иллюстративным носителем для доставки является липосома. Использование липидных составов предусматривают для введения нуклеиновых кислот в клетку-хозяина (*in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*). В другом аспекте нуклеиновая кислота может являться ассоциированной с липидом. Нуклеиновая кислота, ассоциированная с липидом, может являться инкапсулированной в водном внутреннем содержимом липосомы, вкрапленной в липидный бислой липосомы, присоединенной к липосоме посредством связывающей молекулы, ассоциированной как с липосомой, так и с олигонуклеотидом, заключенной в липосому, входящей в состав комплекса с липосомой, диспергированной в растворе,

содержащем липид, смешанной с липидом, объединенной с липидом, содержащейся в липиде в форме суспензии, содержащейся в мицелле или входящей в состав комплекса с мицеллой, или иным образом ассоциированной с липидом. Композиции, ассоциированные с липидом, липидом/ДНК или липидом/экспрессирующим вектором, не являются ограниченными какой-либо конкретной структурой в растворе. Например, они могут присутствовать в бислойной структуре, в форме мицелл или в «схлопнутой» структуре. Они могут также просто являться распределенными в растворе, возможно, формируя агрегаты, не являющиеся однородными по размеру или форме. Липиды представляют собой жирные вещества, которые могут представлять собой природные или синтетические липиды. Например, липиды включают жирные капельки, естественным образом присутствующие в цитоплазме, так же как класс соединений, содержащих алифатические углеводороды с длинной цепью и их производные, такие как жирные кислоты, спирты, амины, аминспирты и альдегиды.

[0218] Вне зависимости от способа, используемого для введения экзогенных нуклеиновых кислот в клетку-хозяина или иным образом подвергания клетки воздействию ингибитора по настоящему изобретению, для подтверждения присутствия рекомбинантной последовательности ДНК в клетке-хозяине, можно проводить множество анализов. Такие анализы включают, например, «молекулярно-биологические» анализы, хорошо известные специалистам в данной области, такие как Саузерн- и Нозерн-блоттинг, RT-ПЦР и ПЦР; «биохимические» анализы, такие как детекция присутствия или отсутствия конкретного пептида, например, иммунологическими способами (виды ELISA и Вестерн-блоттинга) или посредством анализов, описанных в настоящем описании, для идентификации средств, входящих в объем изобретения.

Эффекторные клетки с abTCR

[0219] Некоторые варианты осуществления относятся к эффекторной клетке (такой как Т-клетка), представляющей на своей поверхности abTCR в соответствии с любым из abTCR, описанных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую abTCR, где abTCR является экспрессированным с нуклеиновой кислоты и локализованным на клеточной поверхности эффектора. В некоторых вариантах осуществления, abTCR экзогенно экспрессируют и комбинируют с эффекторной клеткой. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической Т-клетки, Т-клетки-помощника, Т-клетки естественного киллера и супрессорной Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка не экспрессирует субъединицы TCR, из которых происходят TCRD из abTCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ Т-клетку, и TCRD из введенного abTCR содержат последовательности, происходящие из цепей δ и γ TCR, или Т-клетка представляет собой $\gamma\delta$ Т-клетку, и TCRD из введенного abTCR содержат последовательности, происходящие из цепей α и β TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторную клетку модифицируют для блокирования или уменьшения экспрессии одной или обеих из субъединиц эндогенного TCR, из которого происходят TCRD из abTCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ Т-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей α и/или β TCR, и TCRD из введенного abTCR содержат последовательности, происходящие из цепей α и β TCR, или эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ Т-клетку, модифицированную для блокирования или

уменьшения экспрессии цепей γ и/или δ TCR, и TCRD из введенного abTCR содержат последовательности, происходящие из цепей γ и δ TCR. Модификации клеток для нарушения экспрессии гена включают любые такие способы, известные в данной области, включая, например, РНК-интерференцию (например, miРНК, kshРНК, mkРНК), редактирование гена (например, нокаут гена на основе CRISPR или TALEN), и т.п.

5 Например, некоторые варианты осуществления относятся к эффекторной клетке (такой как Т-клетка), содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую abTCR в соответствии с любым из abTCR, описанных в настоящем описании, где abTCR является экспрессированным с нуклеиновой кислоты и локализованным на клеточной

10 поверхности эффектора. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая abTCR, содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первую полипептидную цепь abTCR, и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вторую полипептидную цепь abTCR. В некоторых вариантах осуществления, первая последовательность нуклеиновой кислоты

15 локализована на первом векторе, и вторая последовательность нуклеиновой кислоты локализована на втором векторе. В некоторых вариантах осуществления, первая и вторая последовательности нуклеиновой кислоты локализованы на одном и том же векторе. Векторы могут являться выбранными, например, из группы, состоящей из экспрессирующих векторов и вирусных векторов для млекопитающих (таких как

20 векторы, происходящие из ретровирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, вирусов герпеса и лентивирусов). В некоторых вариантах осуществления, один или несколько векторов интегрированы в геном эффекторной клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления, первая последовательность нуклеиновой кислоты находится под контролем первого промотора, и вторая последовательность нуклеиновой кислоты

25 находится под контролем второго промотора. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй промоторы обладают одинаковой последовательностью. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй промоторы обладают различными последовательностями. В некоторых вариантах осуществления, первая и вторая нуклеиновые кислоты находятся под контролем одного промотора. В некоторых

30 вариантах осуществления, первый, второй и/или единственный промоторы являются индуцируемыми. В некоторых вариантах осуществления, экспрессия первой полипептидной цепи является приблизительно такой же, как экспрессия второй полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления, экспрессия первой полипептидной цепи по меньшей мере приблизительно в два (например, по меньшей

35 мере приблизительно в любое количество из 2, 3, 4, 5 или более) раз превышает экспрессию второй полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления, экспрессия первой полипептидной цепи составляет не более, чем приблизительно 1/2 (например, не более, чем приблизительно любое количество из 1/2, 1/3, 1/4, 1/5 или менее) от экспрессии второй полипептидной цепи. Экспрессию можно определять на

40 уровне мРНК или белка. Уровень экспрессии мРНК можно определять посредством измерения количества мРНК, транскрибированной с нуклеиновой кислоты, с использованием различных хорошо известных способов, включая Нозерн-блоттинг, количественную RT-ПЦР, анализ микромассивов и т.п. Уровень экспрессии белка можно измерять известными способами, включая иммуноцитохимическое окрашивание,

45 твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), анализ Вестерн блоттинга, люминесцентные анализы, масс-спектрометрию, высокоэффективную жидкостную хроматографию, жидкостную хроматографию высокого давления-тандемную масс-спектрометрию и т.п. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка

выбрана из группы, состоящей из цитотоксической Т-клетки, Т-клетки-помощника, Т-клетки естественного киллера и супрессорной Т-клетки.

[0220] Таким образом, некоторые варианты осуществления относятся к эффекторной клетке с abTCR (такой как Т-клетка), экспрессирующей на своей поверхности abTCR в соответствии с любым из abTCR, описанных в настоящем описании, где эффекторная клетка с abTCR содержит а) первую нуклеиновую кислоту, содержащую первый промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей первую полипептидную цепь abTCR, и б) вторую нуклеиновую кислоту, содержащую второй промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую полипептидную цепь abTCR, где первая полипептидная цепь экспрессирована с первой нуклеиновой кислоты, и вторая полипептидная цепь экспрессирована с второй нуклеиновой кислоты с формированием abTCR, и где abTCR локализован на поверхности эффекторной клетки. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй промоторы обладают одинаковой последовательностью. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй промоторы обладают различными последовательностями. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй промоторы являются индуцируемыми. В некоторых вариантах осуществления, экспрессия первой полипептидной цепи является приблизительно такой же, как экспрессия второй полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления, экспрессия первой полипептидной цепи по меньшей мере приблизительно в два (например, по меньшей мере приблизительно в любое количество из 2, 3, 4, 5 или более) раз превышает экспрессию второй полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления, экспрессия первой полипептидной цепи составляет не более, чем приблизительно 1/2 (например, не более, чем приблизительно любое количество из 1/2, 1/3, 1/4, 1/5 или менее) от экспрессии второй полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка не экспрессирует субъединицы TCR, из которого происходят TCRD из abTCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ Т-клетку, и TCRD из введенного abTCR содержат последовательности, происходящие из цепей δ и γ TCR, или эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ Т-клетку, и TCRD из введенного abTCR содержат последовательности, происходящие из цепей α и β TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторную клетку модифицируют для блокирования или уменьшения экспрессии одной или обеих из субъединиц эндогенного TCR, из которого происходят TCRD из abTCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ Т-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей α и/или β TCR, и TCRD из введенного abTCR содержат последовательности, происходящие из цепей α и β TCR, или эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ Т-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей γ и/или δ TCR, и TCRD из введенного abTCR содержат последовательности, происходящие из цепей γ и δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической Т-клетки, Т-клетки-помощника, Т-клетки естественного киллера и супрессорной Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, вектор представляет собой вирусный вектор (такой как лентивирусный вектор), интегрированный в геном эффекторной клетки-хозяина.

[0221] Некоторые варианты осуществления относятся к эффекторной клетке с abTCR (такой как Т-клетка), экспрессирующей на своей поверхности abTCR в соответствии с любым из abTCR, описанных в настоящем описании, где эффекторная клетка с abTCR

содержит а) первый вектор, содержащий первый промотор, функционально связанный с первой последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей первую полипептидную цепь $\alpha\beta$ TCR и б) второй вектор, содержащий второй промотор, функционально связанный с второй последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую полипептидную цепь $\alpha\beta$ TCR, где первая полипептидная цепь экспрессирована с первой последовательности нуклеиновой кислоты, и вторая полипептидная цепь экспрессирована с второй последовательности нуклеиновой кислоты с формированием $\alpha\beta$ TCR, и где $\alpha\beta$ TCR локализован на поверхности эффекторной клетки. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй промоторы обладают одинаковой последовательностью. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй промоторы обладают различными последовательностями. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй промоторы являются индуцируемыми. В некоторых вариантах осуществления, экспрессия первой полипептидной цепи является приблизительно такой же, как экспрессия второй полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления, экспрессия первой полипептидной цепи по меньшей мере приблизительно в два (например, по меньшей мере приблизительно в любое количество из 2, 3, 4, 5 или более) раз превышает экспрессию второй полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления, экспрессия первой полипептидной цепи составляет не более, чем приблизительно 1/2 (например, не более, чем приблизительно любое количество из 1/2, 1/3, 1/4, 1/5 или менее) от экспрессии второй полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка не экспрессирует субъединицы TCR, из которого происходят TCRD из $\alpha\beta$ TCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ T-клетку, и TCRD из введенного $\alpha\beta$ TCR содержат последовательности, происходящие из цепей δ и γ TCR, или эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ T-клетку, и TCRD из введенного $\alpha\beta$ TCR содержат последовательности, происходящие из цепей α и β TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторную клетку модифицируют для блокирования или уменьшения экспрессии одной или обеих из субъединиц эндогенного TCR, из которого происходят TCRD из $\alpha\beta$ TCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ T-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей α и/или β TCR и TCRD из введенного $\alpha\beta$ TCR содержат последовательности, происходящие из цепей TCR α и β цепь, или эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ T-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей γ и/или δ TCR, и TCRD из введенного $\alpha\beta$ TCR содержат последовательности, происходящие из цепей TCR γ и δ . В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической T-клетки, T-клетки-помощника, T-клетки естественного киллера и супрессорной T-клетки. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй векторы представляют собой вирусные векторы (такие как лентивирусные векторы), интегрированные в геном эффекторной клетки-хозяина.

[0222] Некоторые варианты осуществления относятся к эффекторной клетке с $\alpha\beta$ TCR (такой как T-клетка), экспрессирующей на своей поверхности $\alpha\beta$ TCR в соответствии с любым из $\alpha\beta$ TCR, описанных в настоящем описании, где эффекторная клетка с $\alpha\beta$ TCR содержит вектор, содержащий а) первый промотор, функционально связанный с первой последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей первую полипептидную цепь $\alpha\beta$ TCR и б) второй промотор, функционально связанный с второй последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую полипептидную цепь $\alpha\beta$ TCR, где первая полипептидная цепь экспрессирована с первой последовательности нуклеиновой

кислоты, и вторая полипептидная цепь экспрессирована с второй последовательности нуклеиновой кислоты с формированием abTCR, и где abTCR локализован на поверхности эффекторной клетки. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй промоторы обладают одинаковой последовательностью. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй промоторы обладают различными последовательностями. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй промоторы являются индуцируемыми. В некоторых вариантах осуществления, экспрессия первой полипептидной цепи является приблизительно такой же, как экспрессия второй полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления, экспрессия первой полипептидной цепи по меньшей мере приблизительно в два (например, по меньшей мере приблизительно в любое количество из 2, 3, 4, 5 или более) раз превышает экспрессию второй полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления, экспрессия первой полипептидной цепи составляет не более, чем приблизительно 1/2 (например, не более, чем приблизительно любое количество из 1/2, 1/3, 1/4, 1/5 или менее) от экспрессии второй полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка не экспрессирует субъединицы TCR, из которого происходят TCRD из abTCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ T-клетку, и TCRD из введенного abTCR содержат последовательности, происходящие из цепей TCR δ и γ , или эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ T-клетку, и TCRD из введенного abTCR содержат последовательности, происходящие из цепей TCR α и β . В некоторых вариантах осуществления, эффекторную клетку модифицируют для блокирования или уменьшения экспрессии одной или обеих из субъединиц эндогенного TCR, из которого происходят TCRD из abTCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ T-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей α и/или β TCR, и TCRD из введенного abTCR содержат последовательности, происходящие из цепей TCR α и β , или эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ T-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей TCR γ и/или δ , и TCRD из введенного abTCR содержат последовательности, происходящие из цепей TCR γ и δ . В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической T-клетки, T-клетки-помощника, T-клетки естественного киллера и супрессорной T-клетки. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй векторы представляют собой вирусные векторы (такие как лентивирусные векторы), интегрированные в геном эффекторной клетки-хозяина.

[0223] Некоторые варианты осуществления относятся к эффекторной клетке с abTCR (такой как T-клетка), экспрессирующей на своей поверхности abTCR в соответствии с любым из abTCR, описанных в настоящем описании, где эффекторная клетка с abTCR содержит интегрированный в геном хозяина лентивирусный вектор, содержащий а) первый промотор, функционально связанный с первой последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей первую полипептидную цепь abTCR и б) второй промотор, функционально связанный с второй последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую полипептидную цепь abTCR, где первая полипептидная цепь экспрессирована с первой последовательности нуклеиновой кислоты и вторая полипептидная цепь экспрессирована с второй последовательности нуклеиновой кислоты с формированием abTCR, и где abTCR локализован на поверхности эффекторной клетки. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй промоторы обладают одинаковой последовательностью. В некоторых вариантах осуществления, первый и

второй промоторы обладают различными последовательностями. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй промоторы являются индуцируемыми. В некоторых вариантах осуществления, экспрессия первой полипептидной цепи является приблизительно такой же, как экспрессия второй полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления, экспрессия первой полипептидной цепи по меньшей мере приблизительно в два (например, по меньшей мере приблизительно в любое количество из 2, 3, 4, 5 или более) раза превышает экспрессию второй полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления, экспрессия первой полипептидной цепи составляет не более, чем приблизительно 1/2 (например, не более, чем приблизительно любое количество из 1/2, 1/3, 1/4, 1/5 или менее) от экспрессии второй полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка не экспрессирует субъединицы TCR, из которого происходят TCRD из abTCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ T-клетку, и TCRD из введенного abTCR содержат последовательности, происходящие из цепей TCR δ и γ , или эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ T-клетку, и TCRD из введенного abTCR содержат последовательности, происходящие из цепей TCR α и β . В некоторых вариантах осуществления, эффекторную клетку модифицируют для блокирования или уменьшения экспрессии одной или обеих из субъединиц эндогенного TCR, из которого происходят TCRD из abTCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ T-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей α и/или β TCR, и TCRD из введенного abTCR содержат последовательности, происходящие из цепей TCR α и β , или эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ T-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей γ и/или δ TCR, и TCRD из введенного abTCR содержат последовательности, происходящие из цепей γ и δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторную клетку модифицируют для блокирования или уменьшения экспрессии одной или обеих из цепей эндогенного TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической T-клетки, T-клетки-помощника, T-клетки естественного киллера и супрессорной T-клетки.

[0224] Некоторые варианты осуществления относятся к эффекторной клетке с abTCR (такой как T-клетка), экспрессирующей на своей поверхности abTCR в соответствии с любым из abTCR, описанных в настоящем описании, где эффекторная клетка с abTCR содержит вектор, содержащий а) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первую полипептидную цепь abTCR и б) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вторую полипептидную цепь abTCR, где первая и вторая последовательности нуклеиновой кислоты находятся под контролем одного промотора, где первая полипептидная цепь экспрессирована с первой последовательности нуклеиновой кислоты, и вторая полипептидная цепь экспрессирована с второй последовательности нуклеиновой кислоты с формированием abTCR, и где abTCR локализован на поверхности эффекторной клетки. В некоторых вариантах осуществления, промотор является функционально связанным с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2A (такой как P2A, T2A, E2A или F2A), связывающий 3'-конец первой последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность

нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, промотор является функционально связанным с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2А (такой как Р2А, Т2А, Е2А или F2А), связывающий 3'-конец второй последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, промотор является индуцируемым. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка не экспрессирует субъединицы TCR, из которого происходят TCRD из abTCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ T-клетку, и TCRD из введенного abTCR содержат последовательности, происходящие из цепей δ и γ TCR, или эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ T-клетку, и TCRD из введенного abTCR содержат последовательности, происходящие из цепей α и β TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторную клетку модифицируют для блокирования или уменьшения экспрессии одной или обеих из субъединиц эндогенного TCR, из которого происходят TCRD из abTCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ T-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей α и/или β TCR, и TCRD из введенного abTCR содержат последовательности, происходящие из цепей α и β TCR, или эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ T-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей γ и/или δ TCR, и TCRD из введенного abTCR содержат последовательности, происходящие из цепей γ и δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической T-клетки, T-клетки-помощника, T-клетки естественного киллера и супрессорной T-клетки. В некоторых вариантах осуществления, вектор представляет собой вирусный вектор (такой как лентивирусный вектор), интегрированный в геном эффекторной клетки-хозяина.

[0225] Некоторые варианты осуществления относятся к эффекторной клетке с abTCR (такой как T-клетка), экспрессирующей на своей поверхности abTCR в соответствии с любым из abTCR, описанных в настоящем описании, где эффекторная клетка с abTCR содержит интегрированный в геном хозяина лентивирусный вектор, содержащий а) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первую полипептидную цепь abTCR, и б) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вторую полипептидную цепь abTCR, где первая и вторая последовательности нуклеиновой кислоты находятся под контролем одного промотора, где первая полипептидная цепь экспрессирована с первой последовательности нуклеиновой кислоты, и вторая полипептидная цепь экспрессирована с второй последовательности нуклеиновой кислоты с формированием abTCR, и где abTCR локализован на поверхности эффекторной клетки. В некоторых вариантах осуществления, присутствует промотор, функционально связанный с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2А (такой как Р2А, Т2А, Е2А или F2А), связывающий 3'-конец первой последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой

кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, присутствует промотор, функционально связанный с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2A (такой как P2A, T2A, E2A или F2A), связывающий 3'-конец второй последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, промотор является индуцируемым. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка не экспрессирует субъединицы TCR, из которого происходят TCRD из abTCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ T-клетку, и TCRD из введенного abTCR содержат последовательности, происходящие из цепей δ и γ TCR, или эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ T-клетку, и TCRD из введенного abTCR содержат последовательности, происходящие из цепей α и β TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторную клетку модифицируют для блокирования или уменьшения экспрессии одной или обеих из субъединиц эндогенного TCR, из которого происходят TCRD из abTCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ T-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей α и/или β TCR, и TCRD из введенного abTCR содержат последовательности, происходящие из цепей α и β TCR, или эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ T-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей γ и/или δ TCR, и TCRD из введенного abTCR содержат последовательности, происходящие из цепей γ и δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической T-клетки, T-клетки-помощника, T-клетки естественного киллера и супрессорной T-клетки.

[0226] Некоторые варианты осуществления относятся к эффекторной клетке с abTCR (такой как T-клетка), экспрессирующей на своей поверхности abTCR, содержащей а) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первую полипептидную цепь, содержащую, в порядке от amino-конца до карбокси-конца, первый антигенсвязывающий домен и первый TCRD, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 15; и б) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вторую полипептидную цепь, содержащую, в порядке от amino-конца до карбокси-конца, второй антигенсвязывающий домен и второй TCRD, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 16; где первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен формируют подобный Fab антигенсвязывающий модуль, который специфически связывает антиген-мишень, где первый TCRD и второй TCRD формируют TCRM, способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным, химерным, полусинтетическим или полностью синтетическим. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий а) по меньшей мере одну T-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность, содержащую (например, состоящую из) аминокислотную последовательность из SEQ

ID NO: 70 или 71; и/или b) эпитоп-метку, содержащую (например, состоящую из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого антигенсвязывающего домена и/или второй сигнальный пептид с amino-конца от второго антигенсвязывающего домена, где первый и/или второй сигнальный пептиды содержат аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, TCRM является способным привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль, выбранный из группы, состоящей из CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\zeta\epsilon$ и $\zeta\zeta$. В некоторых вариантах осуществления, TCRM способствует формированию комплекса abTCR-CD3. В некоторых вариантах осуществления, присутствует промотор, функционально связанный с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2A (такой как P2A, T2A, E2A или F2A), связывающий 3'-конец первой последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, присутствует промотор, функционально связанный с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2A (такой как P2A, T2A, E2A или F2A), связывающий 3'-конец второй последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, промотор является индуцируемым. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой антиген клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности выбран из группы, состоящей из белка, углевода и липида. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой ассоциированный с заболеванием антиген, такой как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой CD19. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой представленный на поверхности комплекс пептид/МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген), и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид и белок МНС, где пептид происходит из белка, выбранного из группы, состоящей из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1 и PSA. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС представляет собой белок МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-A. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A представляет собой HLA-A02. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A02 представляет собой HLA-A*02:01. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ Т-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей

TCR α и/или β . В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической Т-клетки, Т-клетки-помощника, Т-клетки естественного киллера и супрессорной Т-клетки.

[0227] Некоторые варианты осуществления относятся к эффекторной клетке с абTCR (такой как Т-клетка), экспрессирующей на своей поверхности абTCR, содержащей а) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первую полипептидную цепь, содержащую, в порядке от amino-конца до карбокси-конца, первый антигенсвязывающий домен и первый TCRD, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 17; и б) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вторую полипептидную цепь, содержащую, в порядке от amino-конца до карбокси-конца, второй антигенсвязывающий домен и второй TCRD, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 18; где первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен формируют подобный Fab антигенсвязывающий модуль, который специфически связывает антиген-мишень, где первый TCRD и второй TCRD формируют TCRM, способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным, химерным, полусинтетическим или полностью синтетическим. В некоторых вариантах осуществления, абTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий а) по меньшей мере одну Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность, содержащую (например, состоящую из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 70 или 71; и/или б) эпитоп-метку, содержащую (например, состоящую из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, абTCR дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого антигенсвязывающего домена и/или второй сигнальный пептид с amino-конца от второго антигенсвязывающего домена, где первый и/или второй сигнальный пептиды содержат аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, TCRM является способным привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль выбранный из группы, состоящей из CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\zeta\eta$ и $\zeta\zeta$. В некоторых вариантах осуществления, TCRM способствует формированию комплекса абTCR-CD3. В некоторых вариантах осуществления, присутствует промотор, функционально связанный с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2A (такой как P2A, T2A, E2A или F2A), связывающий 3'-конец первой последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, присутствует промотор, функционально связанный с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты, выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2A (такой как P2A, T2A, E2A или F2A), связывающий 3'-конец второй последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме

одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, промотор является индуцируемым. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой антиген клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности выбран из группы, состоящей из белка, углевода и липида. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой ассоциированный с заболеванием антиген, такой как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой CD19, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D или FCRL5. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой представленный на поверхности комплекс пептид/МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген), и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид и белок МНС, где пептид происходит из белка, выбранного из группы, состоящей из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1 и PSA. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС представляет собой белок МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-A. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A представляет собой HLA-A02. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A02 представляет собой HLA-A*02:01. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ Т-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей α и/или β TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической Т-клетки, Т-клетки-помощника, Т-клетки естественного киллера и супрессорной Т-клетки.

[0228] Некоторые варианты осуществления относятся к эффекторной клетке с abTCR (такой как Т-клетка), экспрессирующей на своей поверхности abTCR, содержащей а) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первую полипептидную цепь, содержащую, в порядке от amino-конца до карбокси-конца, первый антигенсвязывающий домен и первый TCRD, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 19; и б) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вторую полипептидную цепь, содержащую, в порядке от amino-конца до карбокси-конца, второй антигенсвязывающий домен и второй TCRD, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 20; где первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен формируют подобный Fab антигенсвязывающий модуль, который специфически связывает антиген-мишень, где первый TCRD и второй TCRD формируют TCRM, способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным, химерным, полусинтетическим или полностью синтетическим. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий а) по меньшей мере одну Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность, содержащую (например, состоящую из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 70 или 71; и/или б) эпитоп-метку, содержащую (например, состоящую из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит первый сигнальный пептид

с amino-конца от первого антигенсвязывающего домена и/или второй сигнальный пептид с amino-конца от второго антигенсвязывающего домена, где первый и/или второй сигнальный пептиды содержат аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, TCRM является способным привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль выбранный из группы, состоящей из CD3δε, CD3γϵ и ζζ. В некоторых вариантах осуществления, TCRM способствует формированию комплекса abTCR-CD3. В некоторых вариантах осуществления, присутствует промотор, функционально связанный с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2A (такой как P2A, T2A, E2A или F2A), связывающий 3'-конец первой последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, присутствует промотор, функционально связанный с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты, выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2A (такой как P2A, T2A, E2A или F2A), связывающий 3'-конец второй последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, промотор является индуцируемым. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой антиген клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности выбран из группы, состоящей из белка, углевода и липида. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой ассоциированный с заболеванием антиген, такой как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой CD19, ROR1, ROR2, VCMA, GPRC5D или FCRL5. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой представленный на поверхности комплекс пептид/МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген), и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид и белок МНС, где пептид происходит из белка, выбранного из группы, состоящей из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1 и PSA. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС представляет собой белок МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-A. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A представляет собой HLA-A02. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A02 представляет собой HLA-A*02:01. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой αβ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой γδ Т-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей γ и/или δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической Т-клетки, Т-клетки-помощника, Т-клетки естественного киллера и супрессорной Т-

клетки.

[0229] Некоторые варианты осуществления относятся к эффекторной клетке с abTCR (такой как Т-клетка), экспрессирующей на своей поверхности abTCR, содержащей а) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первую полипептидную цепь, содержащую, в порядке от amino-конца до карбокси-конца, первый антигенсвязывающий домен и первый TCRD, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 21; и б) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вторую полипептидную цепь, содержащую, в порядке от amino-конца до карбокси-конца, второй антигенсвязывающий домен и второй TCRD, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 22; где первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен формируют подобный Fab антигенсвязывающий модуль, который специфически связывает антиген-мишень, где первый TCRD и второй TCRD формируют TCRM, способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным, химерным, полусинтетическим или полностью синтетическим. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий а) по меньшей мере один Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность, содержащую (например, состоящую из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 70 или 71; и/или б) эпитоп-метку, содержащую (например, состоящую из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого антигенсвязывающего домена и/или второй сигнальный пептид с amino-конца от второго антигенсвязывающего домена, где первый и/или второй сигнальный пептиды содержат аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, TCRM является способным привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль выбранный из группы, состоящей из CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\zeta\epsilon$ и $\zeta\zeta$. В некоторых вариантах осуществления, TCRM способствует формированию комплекса abTCR-CD3. В некоторых вариантах осуществления, присутствует промотор, функционально связанный с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2A (такой как P2A, T2A, E2A или F2A), связывающий 3'-конец первой последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, присутствует промотор, функционально связанный с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2A (такой как P2A, T2A, E2A или F2A), связывающий 3'-конец второй последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, промотор является индуцируемым. В некоторых вариантах осуществления, антиген-

мишень представляет собой антиген клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности выбран из группы, состоящей из белка, углевода и липида. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой ассоциированный с заболеванием антиген, такой как

5 опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой CD19, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D или FCRL5. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой представленный на поверхности комплекс пептид/МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид, происходящий из

10 ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген), и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид и белок МНС, где пептид происходит из белка, выбранного из группы, состоящей из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1 и PSA. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС представляет собой белок МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-A. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A представляет собой HLA-A02. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A02 представляет собой HLA-A*02:01. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления,

20 эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ Т-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей γ и/или δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической Т-клетки, Т-клетки-помощника, Т-клетки естественного киллера и супрессорной Т-клетки.

25 [0230] Некоторые варианты осуществления относятся к эффекторной клетке с абTCR (такой как Т-клетка), экспрессирующей на своей поверхности абTCR, содержащей а) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первую полипептидную цепь абTCR, содержащую первый домен абTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 23 и б) вторую последовательность нуклеиновой

30 кислоты, кодирующую вторую полипептидную цепь абTCR, содержащую второй домен абTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 24, где первая полипептидная цепь экспрессирована с первой последовательности нуклеиновой кислоты, и вторая полипептидная цепь экспрессирована с второй последовательности нуклеиновой кислоты с формированием абTCR, и где абTCR локализован на поверхности

35 эффекторной клетки. В некоторых вариантах осуществления, присутствует промотор, функционально связанный с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2A (такой как P2A, T2A, E2A или F2A), связывающий 3'-

40 конец первой последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, присутствует промотор, функционально связанный с 5'-концом второй

45 последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2A (такой как P2A, T2A, E2A или F2A), связывающий 3'-конец второй последовательности

нуклеиновой кислоты с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, промотор является индуцируемым. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG, или msc). В некоторых вариантах осуществления, эпитоп-метка содержит любую из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого домена abTCR, и/или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с amino-конца от второго домена abTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ Т-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей α и/или β TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической Т-клетки, Т-клетки-помощника, Т-клетки естественного киллера и супрессорной Т-клетки.

[0231] Некоторые варианты осуществления относятся к эффекторной клетке с abTCR (такой как Т-клетка), экспрессирующей на своей поверхности abTCR, содержащей а) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первую полипептидную цепь abTCR, содержащую первый домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 25, и б) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вторую полипептидную цепь abTCR, содержащую второй домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 26, где первая полипептидная цепь экспрессирована с первой последовательности нуклеиновой кислоты, и вторая полипептидная цепь экспрессирована с второй последовательности нуклеиновой кислоты с формированием abTCR, и где abTCR локализован на поверхности эффекторной клетки. В некоторых вариантах осуществления, присутствует промотор, функционально связанный с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты, выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2A (такой как P2A, T2A, E2A или F2A), связывающий 3'-конец первой последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, присутствует промотор, функционально связанный с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2A (такой как P2A, T2A, E2A или F2A), связывающий 3'-конец второй последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора.

В некоторых вариантах осуществления, промотор является индуцируемым. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или мус). В некоторых вариантах осуществления, эпитоп-метка содержит любую из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого домена abTCR и/или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с amino-конца от второго домена abTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ Т-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей α и/или β TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической Т-клетки, Т-клетки-помощника, Т-клетки естественного киллера и супрессорной Т-клетки.

[0232] Некоторые варианты осуществления относятся к эффекторной клетке с abTCR (такой как Т-клетка), экспрессирующей на своей поверхности abTCR, содержащей а) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первую полипептидную цепь abTCR, содержащую первый домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 27, и б) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вторую полипептидную цепь abTCR, содержащую второй домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 28, где первая полипептидная цепь экспрессирована с первой последовательности нуклеиновой кислоты, и вторая полипептидная цепь экспрессирована с второй последовательности нуклеиновой кислоты с формированием abTCR, и где abTCR локализован на поверхности эффекторной клетки. В некоторых вариантах осуществления, присутствует промотор, функционально связанный с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2A (такой как P2A, T2A, E2A или F2A), связывающий 3'-конец первой последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, присутствует промотор, функционально связанный с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2A (такой как P2A, T2A, E2A или F2A), связывающий 3'-конец второй последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, промотор является индуцируемым. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий Т-клеточную костимулирующую

передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или msc). В некоторых вариантах осуществления, эпитоп-метка содержит любую из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с 5 амино-конца от первого домена abTCR, и/или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с 5 амино-конца от второго домена abTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 10 49. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ T-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ T-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей α и/или β TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической T-клетки, T-клетки-помощника, T-клетки естественного киллера и супрессорной T-клетки. 15

[0233] Некоторые варианты осуществления относятся к эффекторной клетке с abTCR (такой как T-клетка), экспрессирующей на своей поверхности abTCR, содержащей а) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первую полипептидную цепь abTCR, содержащую первый домен abTCR, содержащий аминокислотную 20 последовательность из SEQ ID NO: 29, и б) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вторую полипептидную цепь abTCR, содержащую второй домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 30, где первая полипептидная цепь экспрессирована с первой последовательности нуклеиновой кислоты, и вторая полипептидная цепь экспрессирована с второй последовательности 25 нуклеиновой кислоты с формированием abTCR, и где abTCR локализован на поверхности эффекторной клетки. В некоторых вариантах осуществления, присутствует промотор, функционально связанный с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты, выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2A (такой как P2A, T2A, E2A или F2A), связывающий 3'-конец 30 первой последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, присутствует промотор, функционально связанный с 5'-концом второй 35 последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2A (такой как P2A, T2A, E2A или F2A), связывающий 3'-конец второй последовательности 40 нуклеиновой кислоты с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, промотор является индуцируемым. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один 45 вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий T-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG, или msc). В некоторых вариантах осуществления, эпитоп-метка содержит любую из аминокислотных

последовательностей из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с аминоконца от первого домена abTCR, и/или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с аминоконца от второго домена abTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ T-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ T-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей γ и/или δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической T-клетки, T-клетки-помощника, T-клетки естественного киллера и супрессорной T-клетки.

[0234] Некоторые варианты осуществления относятся к эффекторной клетке с abTCR (такой как T-клетка), экспрессирующей на своей поверхности abTCR, содержащей а) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первую полипептидную цепь abTCR, содержащую первый домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 31, и б) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вторую полипептидную цепь abTCR, содержащую второй домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 32, где первая полипептидная цепь экспрессирована с первой последовательности нуклеиновой кислоты, и вторая полипептидная цепь экспрессирована с второй последовательности нуклеиновой кислоты с формированием abTCR, и где abTCR локализован на поверхности эффекторной клетки. В некоторых вариантах осуществления, присутствует промотор, функционально связанный с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты, выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2A (такой как P2A, T2A, E2A или F2A), связывающий 3'-конец первой последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, присутствует промотор, функционально связанный с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2A (такой как P2A, T2A, E2A или F2A), связывающий 3'-конец второй последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, промотор является индуцируемым. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий T-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG, или msc). В некоторых вариантах осуществления, эпитоп-метка содержит любую из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с аминоконца от первого домена abTCR, и/или вторая полипептидная цепь дополнительно

содержит второй сигнальный пептид с amino-конца от второго домена abTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ T-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ T-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей γ и/или δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической T-клетки, T-клетки-помощника, T-клетки естественного киллера и супрессорной T-клетки.

[0235] Некоторые варианты осуществления относятся к эффекторной клетке с abTCR (такой как T-клетка), экспрессирующей на своей поверхности abTCR, содержащей а) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первую полипептидную цепь abTCR, содержащую первый домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 33, и б) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вторую полипептидную цепь abTCR, содержащую второй домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 34, где первая полипептидная цепь экспрессирована с первой последовательности нуклеиновой кислоты, и вторая полипептидная цепь экспрессирована с второй последовательности нуклеиновой кислоты с формированием abTCR, и где abTCR локализован на поверхности эффекторной клетки. В некоторых вариантах осуществления, присутствует промотор, функционально связанный с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2A (такой как P2A, T2A, E2A или F2A), связывающий 3'-конец первой последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, присутствует промотор, функционально связанный с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2A (такой как P2A, T2A, E2A или F2A), связывающий 3'-конец второй последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, промотор является индуцируемым. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий T-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или myc). В некоторых вариантах осуществления, эпитоп-метка содержит любую из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого домена abTCR, и/или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с amino-конца от второго домена abTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:

49. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ Т-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей γ и/или δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка
5 выбрана из группы, состоящей из цитотоксической Т-клетки, Т-клетки-помощника, Т-клетки естественного киллера и супрессорной Т-клетки.

[0236] Некоторые варианты осуществления относятся к эффекторной клетке с abTCR (такой как Т-клетка), экспрессирующей на своей поверхности abTCR, содержащей а) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первую полипептидную
10 цепь abTCR, содержащую первый домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 35, и б) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вторую полипептидную цепь abTCR, содержащую второй домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 36, где первая полипептидная цепь экспрессирована с первой последовательности нуклеиновой
15 кислоты, и вторая полипептидная цепь экспрессирована с второй последовательности нуклеиновой кислоты с формированием abTCR, и где abTCR локализован на поверхности эффекторной клетки. В некоторых вариантах осуществления, присутствует промотор, функционально связанный с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты выбранный из группы, состоящей из
20 внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2A (такой как P2A, T2A, E2A или F2A), связывающий 3'-конец первой последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме
25 одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, присутствует промотор, функционально связанный с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2A (такой
30 как P2A, T2A, E2A или F2A), связывающий 3'-конец второй последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, промотор является индуцируемым. В некоторых
35 вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или msc). В некоторых вариантах осуществления, эпитоп-метка содержит любую из аминокислотных
40 последовательностей из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого домена abTCR, и/или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с amino-конца от второго домена abTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды
45 содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ Т-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии

цепей γ и/или δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической Т-клетки, Т-клетки-помощника, Т-клетки естественного киллера и супрессорной Т-клетки.

[0237] Некоторые варианты осуществления относятся к эффекторной клетке с абTCR (такой как Т-клетка), экспрессирующей на своей поверхности абTCR, содержащей а) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первую полипептидную цепь абTCR, содержащую первый домен абTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 42, и б) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вторую полипептидную цепь абTCR, содержащую второй домен абTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 43, где первая полипептидная цепь экспрессирована с первой последовательности нуклеиновой кислоты, и вторая полипептидная цепь экспрессирована с второй последовательности нуклеиновой кислоты с формированием абTCR, и где абTCR локализован на поверхности эффекторной клетки. В некоторых вариантах осуществления, присутствует промотор, функционально связанный с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2A (такой как P2A, T2A, E2A или F2A), связывающий 3'-конец первой последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, присутствует промотор, функционально связанный с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2A (такой как P2A, T2A, E2A или F2A), связывающий 3'-конец второй последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты, и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, промотор является индуцируемым. В некоторых вариантах осуществления, абTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или msc). В некоторых вариантах осуществления, эпитоп-метка содержит любую из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого домена абTCR, и/или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с amino-конца от второго домена абTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ Т-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей γ и/или δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической Т-клетки, Т-клетки-помощника, Т-клетки естественного киллера и супрессорной Т-клетки.

[0238] Некоторые варианты осуществления относятся к эффекторной клетке с abTCR (такой как Т-клетка), экспрессирующей на своей поверхности abTCR, содержащей а) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первую полипептидную цепь abTCR, содержащую первый домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 42, и б) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вторую полипептидную цепь abTCR, содержащую второй домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 54, где первая полипептидная цепь экспрессирована с первой последовательности нуклеиновой кислоты, и вторая полипептидная цепь экспрессирована с второй последовательности нуклеиновой кислоты с формированием abTCR, и где abTCR локализован на поверхности эффекторной клетки. В некоторых вариантах осуществления, присутствует промотор, функционально связанный с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2А (такой как Р2А, Т2А, Е2А или F2А), связывающий 3'-конец первой последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, присутствует промотор, функционально связанный с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2А (такой как Р2А, Т2А, Е2А или F2А), связывающий 3'-конец второй последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, промотор является индуцируемым. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG, или msc). В некоторых вариантах осуществления, эпитоп-метка содержит любую из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого домена abTCR, и/или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с amino-конца от второго домена abTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ Т-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей γ и/или δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической Т-клетки, Т-клетки-помощника, Т-клетки естественного киллера и супрессорной Т-клетки.

[0239] Некоторые варианты осуществления относятся к эффекторной клетке с abTCR (такой как Т-клетка), экспрессирующей на своей поверхности abTCR, содержащей а) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первую полипептидную

цепь abTCR, содержащую первый домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 55, и b) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вторую полипептидную цепь abTCR, содержащую второй домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 54, где первая полипептидная цепь экспрессирована с первой последовательности нуклеиновой кислоты, и вторая полипептидная цепь экспрессирована с второй последовательности нуклеиновой кислоты с формированием abTCR, и где abTCR локализован на поверхности эффекторной клетки. В некоторых вариантах осуществления, присутствует промотор, функционально связанный с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты, выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2A (такой как P2A, T2A, E2A или F2A), связывающий 3'-конец первой последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, присутствует промотор, функционально связанный с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2A (такой как P2A, T2A, E2A или F2A), связывающий 3'-конец второй последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, промотор является индуцируемым. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий T-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или msc). В некоторых вариантах осуществления, эпитоп-метка содержит любую из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого домена abTCR, и/или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с amino-конца от второго домена abTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ T-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ T-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей γ и/или δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической T-клетки, T-клетки-помощника, T-клетки естественного киллера и супрессорной T-клетки.

[0240] Некоторые варианты осуществления относятся к эффекторной клетке с abTCR (такой как T-клетка), экспрессирующей на своей поверхности abTCR, содержащей а) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первую полипептидную цепь abTCR, содержащую первый домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 56, и b) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вторую полипептидную цепь abTCR, содержащую второй домен

abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 54, где первая полипептидная цепь экспрессирована с первой последовательности нуклеиновой кислоты, и вторая полипептидная цепь экспрессирована с второй последовательности нуклеиновой кислоты с формированием abTCR, и где abTCR локализован на поверхности эффекторной клетки. В некоторых вариантах осуществления, присутствует промотор, функционально связанный с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2A (такой как P2A, T2A, E2A или F2A), связывающий 3'-конец первой последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, присутствует промотор, функционально связанный с 5'-концом второй последовательности нуклеиновой кислоты, и присутствует линкер из нуклеиновой кислоты выбранный из группы, состоящей из внутреннего участка связывания рибосомы (IRES) и нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2A (такой как P2A, T2A, E2A или F2A), связывающий 3'-конец второй последовательности нуклеиновой кислоты с 5'-концом первой последовательности нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируются в форме одной РНК под контролем промотора. В некоторых вариантах осуществления, промотор является индуцируемым. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или msc). В некоторых вариантах осуществления, эпитоп-метка содержит любую из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого домена abTCR, и/или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с amino-конца от второго домена abTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ Т-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей TCR γ и/или δ . В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической Т-клетки, Т-клетки-помощника, Т-клетки естественного киллера и супрессорной Т-клетки.

[0241] В любом из некоторых таких вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, эффекторная клетка с abTCR обладала более низкой скоростью интернализации химерного рецептора по сравнению с соответствующей эффекторной клеткой с CAR (такой как эффекторная клетка, представляющая на своей поверхности CAR, содержащий группу антитела из abTCR, например, CAR, содержащий scFv, содержащий переменные домены антитела из abTCR) при сравнении в сходных условиях. Например, в некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка с abTCR обладает более низкой скоростью интернализации химерного рецептора по сравнению с соответствующей эффекторной клеткой с CAR после зависимой от антигена-

мишени стимуляции эффекторных клеток с химерным рецептором в сходных условиях. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка с abTCR обладает менее, чем 50% (например, менее, чем приблизительно любым из 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 или 5%, включая любые диапазоны между этими значениями) интернализации abTCR через приблизительно 90 минут после стимуляции антигеном-мишенью для abTCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка с abTCR представляет собой Т-клетку с abTCR.

[0242] В любом из некоторых таких вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, эффекторная клетка с abTCR обладает более низкой скоростью и/или встречаемостью истощения по сравнению с соответствующей эффекторной клеткой с CAR (такой как эффекторная клетка, представляющая на своей поверхности CAR, содержащий группу антитела из abTCR) при сравнении в сходных условиях. Истощение эффекторных клеток можно определять любыми способами, известными в данной области, например, посредством измерения уровня экспрессии маркеров истощения, включая, без ограничения, PD-1, TIM-3 и LAG-3. Например, в некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка с abTCR обладает более низким уровнем экспрессии одного или нескольких маркеров истощения (таких как PD-1, TIM-3 или LAG-3) по сравнению с соответствующей эффекторной клеткой с CAR после зависимой от антигена-мишени стимуляции эффекторных клеток с химерным рецептором в сходных условиях. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка с abTCR обладает более низкой частотой положительности по одному или нескольким маркерам истощения (таким как PD-1, TIM-3 или LAG-3) по сравнению с соответствующей эффекторной клеткой с CAR после зависимой от антигена-мишени стимуляции эффекторных клеток с химерным рецептором в сходных условиях. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка с abTCR обладает частотой менее, чем приблизительно 50% (например, менее, чем приблизительно любым из 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, 1%, включая любые диапазоны между этими значениями) положительности по одному или нескольким маркерам истощения (таким как PD-1, TIM-3 или LAG-3) после стимуляции антигеном-мишенью для abTCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка с abTCR представляет собой Т-клетку с abTCR. Частоту встречаемости можно рассчитывать любыми способами, известными в данной области, например, посредством количественного определения процента эффекторных клеток с химерным рецептором, положительных по маркеру истощения в популяции эффекторных клеток с химерным рецептором, где процент клеток, положительных по маркеру истощения, представляет собой частоту встречаемости.

[0243] В любом из некоторых таких вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, эффекторная клетка с abTCR обладает более низкой скоростью и/или встречаемостью терминальной дифференцировки по сравнению с соответствующей эффекторной клеткой с CAR (такой как эффекторная клетка, представляющая на своей поверхности CAR, содержащий группу антитела из abTCR) при сравнении в сходных условиях. Терминальную дифференцировку можно определять любыми способами, известными в данной области, например, посредством измерения уровня экспрессии маркеров дифференцировки, включая, без ограничения, CD28, CCR7 и гранзим В. Например, в некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка с abTCR обладает более низким уровнем экспрессии одного или нескольких маркеров терминальной дифференцировки (такого как гранзим В) и/или более высоким уровнем экспрессии одного или нескольких маркеров нетерминальной дифференцировки (таких как CD28 или CCR7) по сравнению с соответствующей эффекторной клеткой с CAR в сходных

условиях. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка с abTCR обладает более низкой частотой положительности по одному или нескольким маркерам терминальной дифференцировки (таких как гранзим В) и/или более высокой частотой положительности по одному или нескольким маркерам нетерминальной дифференцировки (таким как CD28 или CCR7) по сравнению с соответствующей эффекторной клеткой с CAR в сходных условиях. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка с abTCR обладает менее, чем приблизительно 50% (например, менее, чем приблизительно любым из 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, 1%, включая любые диапазоны между этими значениями) частотой положительности по одному или нескольким маркерам терминальной дифференцировки (таким как гранзим В) и/или более, чем приблизительно 10% (например, более, чем приблизительно любым из 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, или 95%, включая любые диапазоны между этими значениями) частотой положительности по одному или нескольким маркерам нетерминальной дифференцировки (таким как CD28 или CCR7) после стимуляции антигеном-мишенью для abTCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка с abTCR представляет собой Т-клетку с abTCR. Частоту встречаемости можно рассчитывать любыми способами, известными в данной области, например, посредством количественного определения процента эффекторных клеток с химерным рецептором, положительных по маркеру маркер терминальной дифференцировки в популяции эффекторных клеток с химерным рецептором, где процент клеток, положительных по маркеру терминальной дифференцировки, представляет собой частоту встречаемости.

[0244] В любом из некоторых таких вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, эффекторная клетка с abTCR обладает большей скоростью пролиферации по сравнению с соответствующей эффекторной клеткой с CAR (такой как эффекторная клетка, представляющая на своей поверхности CAR, содержащий группу антитела из abTCR) при сравнении в сходных условиях. Пролиферацию можно определять любыми способами, известными в данной области, такими как измерение разведения красителя. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка с abTCR представляет собой Т-клетку с abTCR.

Получение abTCR

[0245] В некоторых вариантах осуществления, в соответствии с любым из abTCR, описанных в настоящем описании, группа антитела представляет собой подобный Fab антигенсвязывающий модуль, содержащий последовательности из моноклонального антитела. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль содержит домены V_H , C_H1 , V_L , и C_L из моноклонального антитела.

Моноклональные антитела можно получать, например, с использованием способов гибридомы, таких как способы, описанные в Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495 (1975) и Sergeeva et al., *Blood*, 117(16):4262-4272.

[0246] В способе гибридомы, хомяка, мышь или другого подходящего животного-хозяина, как правило, иммунизируют иммунизирующим средством для активации лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые могут специфически связываться с иммунизирующим средством. Альтернативно, можно иммунизировать лимфоциты *in vitro*. Иммунизирующее средство может включать полипептид представляющего интерес белка или слитый с ним белок, или комплекс, содержащий по меньшей мере две молекулы, такой как комплекс, содержащий пептид и белок МНС. Как правило, используют либо лимфоциты периферической крови («PBL»), если желательны клетки человеческого происхождения, либо клетки селезенки или

клетки лимфоузлов, если желательны источники из не относящихся к человеку млекопитающих. Затем лимфоциты сливают с иммортализованной линией клеток с использованием подходящего вызывающего слияние клеток средства, такого как полиэтиленгликоль, для получения клеток гибридомы. См., например, Goding, *Monoclonal*

5 *Antibodies: Principles and Practice* (New York: Academic Press, 1986), pp. 59-103.

Иммортализованные линии клеток обычно представляют собой трансформированные клетки млекопитающих, в частности, клетки миеломы, происходящие из грызунов, быка и человека. Обычно используют линии клеток миеломы крысы или мыши. Клетки гибридомы можно культивировать в подходящей культуральной среде, предпочтительно

10 содержащей одно или несколько веществ, подавляющих рост или выживание не слитых иммортализованных клеток. Например, если в родительских клетках отсутствует фермент гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансфераза (HGPRT или HPRT), культуральная среда для гибридомы, как правило, содержит гипоксантин, аминоптерин и тимидин («среда HAT»), которые предотвращают рост HGPRT-дефицитных клеток.

15 [0247] В некоторых вариантах осуществления, иммортализованные линии клеток эффективно сливаются, поддерживают высокий уровень экспрессии антитела выбранными продуцирующими антитело клетками и являются чувствительными к среде, такой как среда HAT. В некоторых вариантах осуществления, иммортализованные линии клеток представляют собой линии миеломы мышей, которые можно получать,

20 например, из Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California и Американской коллекции типовых культур, Manassas, Virginia. Описаны также линии клеток миеломы человека и гетеромиеломы мыши-человека для продукции человеческих моноклональных антител. Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al. *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* (Marcel Dekker, Inc.: New York, 1987) pp.

25 51-63.

[0248] Затем в культуральной среде, в которой культивировали клетки гибридомы, можно анализировать присутствие моноклональных антител, направленных против полипептида. Специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых

30 клетками гибридомы, можно определять посредством иммунопреципитации или посредством анализа связывания *in vitro*, такого как радиоиммунный анализ (RIA) или твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). Такие способы и анализы известны в данной области. Аффинность связывания моноклонального антитела можно, например, определять посредством анализа Скэтчарда по Munson and Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

35 [0249] После идентификации желательных клеток гибридомы клоны можно субклонировать способами лимитирующих разведений и выращивать общепринятыми способами. Goding, выше. Подходящая для данной цели культуральная среда включает, например, среду Игла, модифицированную Дульбекко, и среду RPMI-1640. Альтернативно, клетки гибридомы можно выращивать *in vivo* в форме асцитов у

40 млекопитающего.

[0250] Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, можно выделять или очищать из культуральной среды или асцитной жидкости общепринятыми способами очистки иммуноглобулинов, такими как, например, очистка на сефарозе с белком А, хроматография на гидроксилпатите, электрофорез в геле, диализ или аффинная

45 хроматография.

[0251] В некоторых вариантах осуществления, в соответствии с любым из abTCR, описанных в настоящем описании, группа антитела представляет собой подобный Fab антигенсвязывающий модуль, содержащий последовательности из клона, отобранного

из библиотеки групп антител (такой как библиотека фагов, представляющих фрагменты scFv или Fab). Клон можно идентифицировать посредством скрининга комбинаторных библиотек по фрагментам антитела с желательной активностью или несколькими видами активности. Например, множество способов известно в данной области для

5 получения библиотек фагового дисплея и скрининга таких библиотек по антителам, обладающих желательными характеристиками связывания. Обзор таких способов приведен, например, в Hoogenboom et al., *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, N.J., 2001) и дополнительное описание, например, в McCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks et

10 al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, *Methods in Molecular Biology* 248: 161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, N.J., 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); и Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004).

[0252] В конкретных способах фагового дисплея, репертуары генов V_H и V_L по

15 отдельности клонируют посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) и подвергают случайной рекомбинации в библиотеках фагов, которые затем можно подвергать скринингу по антигенсвязывающему фагу, как описано в Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Фаги, как правило, экспонируют фрагменты антител, либо в форме одноцепочечных Fv (scFv) фрагментов, либо в форме фрагментов Fab. Библиотеки из

20 иммунизированных источников обеспечивают высоко аффинные антитела против иммуногена без необходимости конструирования гибридом. Альтернативно, можно клонировать наивный репертуар (например, от человека) для обеспечения одного источника антител против широкого диапазона не собственных, а также собственных

25 антигенов без какой-либо иммунизации, как описано в Griffiths et al., *EMBO J*, 12: 725-734 (1993). Наконец, наивные библиотеки можно также получать синтетически посредством клонирования не подвергнутых реаранжировке фрагментов V-гена из стволовых клеток, и использования праймеров для ПЦР, содержащих случайную последовательность, для кодирования высоко вариабельных областей CDR3 и для

30 осуществления реаранжировки *in vitro*, как описано в Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Патентные публикации, описывающие фаговые библиотеки человеческих антител, включают, например: Патент США No. 5750373, и Публикации патентов США No. 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 и 2009/0002360.

[0253] Подобный Fab антигенсвязывающий модуль можно получать с использованием

35 фагового дисплея для скрининга библиотек по антителам, специфическим для антигена-мишени (такого как комплекс пептид/МНС класса I/II или антиген клеточной поверхности). Библиотека может представлять собой библиотеку фагового дисплея человеческих scFv, обладающую разнообразием по меньшей мере один $\times 10^9$ (например,

40 по меньшей мере приблизительно любым из 1×10^9 , $2,5 \times 10^9$, 5×10^9 , $7,5 \times 10^9$, 1×10^{10} , $2,5 \times 10^{10}$, 5×10^{10} , $7,5 \times 10^{10}$ или 1×10^{11}) уникальных фрагментов человеческих антител. В некоторых вариантах осуществления, библиотека представляет собой наивную человеческую библиотеку, сконструированную из ДНК, выделенной из РМВС и селезенки человека от здоровых доноров, включающую все подсемейства человеческих

45 тяжелых и легких цепей. В некоторых вариантах осуществления, библиотека представляет собой наивную человеческую библиотеку, сконструированную из ДНК, выделенной из РМВС, выделенных от пациентов с различными заболеваниями, таких как пациенты с аутоиммунными заболеваниями, пациенты с злокачественными

опухолями и пациенты с инфекционными заболеваниями. В некоторых вариантах осуществления, библиотека представляет собой полусинтетическую человеческую библиотеку, где тяжелая цепь CDR3 является полностью рандомизированной, где все аминокислоты (за исключением цистеина) с равной вероятностью присутствуют в
любом данном положении (см., например, Hoet, R.M. et al., Nat. Biotechnol. 23(3):344-348, 2005). В некоторых вариантах осуществления, CDR3 тяжелой цепи из полусинтетической человеческой библиотеки имеет длину от приблизительно 5 до приблизительно 24 (такой как приблизительно любая из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, или 24) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, библиотека
представляет собой полностью синтетическую библиотеку фагового дисплея. В некоторых вариантах осуществления, библиотека представляет собой не относящуюся к человеку библиотеку фагового дисплея.

[0254] Клоны фагов, связывающие антиген-мишень с высокой аффинностью, можно отбирать посредством повторяющегося связывания фага с антигеном-мишенью, связанным с твердой подложкой (например, такой как, бусины для пэннинга раствора или клетки млекопитающих для пэннинга клеток), с последующим удалением не связавшегося фага и посредством элюции специфически связавшегося фага. В одном из примеров пэннинга раствора, антиген-мишень можно биотинилировать для иммобилизации на твердой подложке. Биотинилированный антиген-мишень смешивают с библиотекой фагов и с твердой подложкой, такой как конъюгированные со стрептавидином Dynabeads M-280, и затем выделяют комплексы антиген-мишень-фаг-бусина. Связавшиеся клоны фагов затем элюируют и используют для инфекции подходящей клетки-хозяина, такой как *E. coli* XL1-Blue, для экспрессии и очистки. В одном из примеров пэннинга клеток, клетки T2 (TAP-дефицитная, HLA-A*02:01⁺ лимфобластная линия клеток), нагруженные пептидом AFP, смешивают с библиотекой фагов, после чего клетки собирают, и связанные клоны элюируют и используют для инфекции подходящей клетки-хозяина для экспрессии и очистки. Пэннинг можно проводить за множество (например, приблизительно любое количество из 2, 3, 4, 5, 6 или более) циклов с использованием пэннинга раствора, пэннинга клеток или комбинации обоих, для обогащения по клонам фагов, специфически связывающих антиген-мишень. Обогащенные клоны фагов можно тестировать по специфическому связыванию с антигеном-мишенью посредством любых способов, известных в данной области, включая, например, ELISA и FACS.

Человеческие и гуманизированные группы антител

[0255] Группы антител abTCR могут являться человеческими или гуманизированными. Гуманизированные формы не относящихся к человеку (например, мышинных) групп антител представляют собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, или другие антигенсвязывающие последовательности антител), которые, как правило, содержат минимальную последовательность, происходящую из не относящегося к человеку иммуноглобулина. Гуманизированные группы антител включают человеческие иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (реципиентное антитело), в которых остатки из CDR реципиента заменяют остатками из CDR не относящихся к человеку видов (донорного антитела), таких как мышь, крыса или кролик, обладающими желаемой специфичностью, аффинностью и емкостью. В некоторых случаях, каркасные остатки Fv человеческого иммуноглобулина заменяют соответствующими не относящимися к человеку остатками. Гуманизированные группы антител могут также содержать остатки, не обнаруженные ни в группе антитела-реципиента, ни в импортируемых

последовательностях CDR или каркасной области. Как правило, гуманизированная группа антитела может содержать в основном все из по меньшей мере одного, а обычно, двух переменных доменов, в которых все или в основном все области CDR соответствуют областям не относящегося к человеку иммуноглобулина, и все или в основном все области FR представляют собой области из консенсусной последовательности человеческого иммуноглобулина. См., например, Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332: 323-329 (1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992).

[0256] Как правило, гуманизированная группа антитела обладает одним или несколькими аминокислотными остатками, введенными в нее из не относящегося к человеку источника. Эти не относящиеся к человеку аминокислотные остатки часто обозначают как «импортируемые» остатки, которые, как правило, берут из «импортируемого» переменного домена. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, гуманизацию можно проводить в основном по способу Winter и соавторов (Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536 (1988)), посредством замены последовательностями одной CDR или нескольких CDR грызунов соответствующих последовательностей человеческой группы антитела. Соответственно, такие «гуманизированные» группы антител представляют собой группы антител (Патент США No. 4816567), где по существу менее чем один интактный человеческий переменный домен заменен соответствующей последовательностью из не относящихся к человеку видов. На практике, гуманизированные группы антител, как правило, представляют собой человеческие группы антител, в которых некоторые остатки CDR и, возможно, некоторые остатки FR, заменены остатками из аналогичных участков антител грызунов.

[0257] В качестве альтернативы гуманизации, можно получать человеческие группы антител. Например, в настоящее время является возможным получение трансгенных животных (например, мышей), способных при иммунизации продуцировать полный репертуар человеческих антител в отсутствие продукции эндогенных иммуноглобулинов. Например, описано, что гомозиготная делеция соединительного гена тяжелой цепи антитела (JH) в химерных и мутантных по зародышевой линии мышах приводит к полному ингибированию продукции эндогенных антител. Перенос массива зародышевых генов иммуноглобулинов человека таким мутантным по зародышевой линии мышам приводит к продукции человеческих антител при стимуляции антигеном. См., например, Jakobovits et al., PNAS USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993); Патенты США No. 5545806, 5569825, 5591669; 5545807; и WO 97/17852. Альтернативно, человеческие антитела можно получать посредством введения локусов иммуноглобулинов человека трансгенным животным, например, мышам, у которых эндогенные гены иммуноглобулинов частично или полностью инактивированы. При стимуляции наблюдают продукцию человеческих антител, сильно напоминающую продукцию, наблюдаемую у человека, во всех отношениях, включая реаранжировку генов, сборку и репертуар антител. Этот способ описан, например, в Патентах США No. 5545807; 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; и 5661016, и в Marks et al., Bio/Technology, 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature, 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature, 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology, 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology, 14: 826 (1996); Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol., 13: 65-93 (1995).

[0258] Человеческие антитела можно получать также посредством активированных

in vitro В-клеток (см. Патенты США 5567610 и 5229275) или с использованием различных способов, известных в данной области, включая библиотеки фагового дисплея. Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991). Способы Cole et al. и Boerner et al. также доступны для получения человеческих моноклональных антител. Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) и Boerner et al., J. Immunol., 147(1): 86-95 (1991).

Варианты

[0259] В некоторых вариантах осуществления, предусмотрены варианты аминокислотных последовательностей групп антител, представленных в настоящем описании. Например, может являться желательным улучшение аффинности связывания и/или других биологических свойств группы антитела. Варианты аминокислотной последовательности группы антитела можно получать посредством введения соответствующих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую группу антитела, или посредством пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции из, и/или вставки в, и/или замены остатков в пределах аминокислотных последовательностей группы антитела. Любую комбинацию делеции, вставки и замены можно осуществлять для получения конечной конструкции, при условии, что конечная конструкция обладает желательными характеристиками, например, связыванием антигена.

[0260] Некоторые варианты осуществления относятся к вариантам группы антитела, обладающим одной или несколькими аминокислотными заменами. Участки, представляющие интерес для замещающего мутагенеза, включают HVR и FR. Можно вводить аминокислотные замены в представляющую интерес группу антитела, и проводить скрининг продуктов по желательной активности, например, сохранению/улучшению связывания антигена или уменьшенной иммуногенности.

[0261] Консервативные замены показаны в таблице 1 ниже.

ТАБЛИЦА 1: КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЗАМЕНЫ

Исходный остаток	Иллюстративные замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин	Leu

[0262] Аминокислоты могут быть сгруппированы в различные классы в соответствии с общими свойствами боковых цепей:

- a. гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- b. нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- c. кислые: Asp, Glu;
- d. основные: His, Lys, Arg;

- 5 e. остатки, которые оказывают влияние на ориентацию цепи: Gly, Pro;
- f. ароматические: Trp, Tyr, Phe.

[0263] Неконсервативные замены влекут за собой замену члена одного из этих классов на другой класс.

- [0264] Иллюстративным вариантом замены является подвергнутая аффинному созреванию группа антитела, которую можно удобно получать, например, с использованием способов аффинного созревания на основе фагового дисплея. Кратко, в один или несколько остатков CDR вносят мутации, и вариант группы антител экспонируют на фаге и подвергают скринингу по конкретной биологической активности (например, аффинности связывания). Изменения (например, замены) можно
- 15 осуществлять в HVR, например, для улучшения аффинности группы антитела. Такие изменения можно осуществлять в «горячих точках» HVR, т.е., в остатках, кодируемых кодонами, которые подвержены мутациям с высокой частотой в ходе процесса соматического созревания (см., например, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), и/или в определяющих специфичность остатках (SDR), с тестированием
- 20 полученного варианта V_H или V_L по аффинности связывания. Аффинное созревание в результате конструирования и повторного отбора из вторичных библиотек, описано, например, в Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).)

- [0265] В некоторых вариантах осуществления аффинного созревания, разнообразие вводят в вариабельные гены, выбранные для созревания, посредством любого из множества способов (например, ПЦР с пониженной точностью, перетасовка цепей или направленный мутагенез с использованием олигонуклеотидов). Затем получают вторичную библиотеку. Затем проводят скрининг этой библиотеки для идентификации любых вариантов группы антитела с желательной аффинностью. Другой способ
- 30 введения разнообразия включает направленные на HVR способы, в которых несколько остатков HVR (например, 4-6 остатков одновременно) рандомизируют. Остатки HVR, вовлеченные в связывание антигена, можно специфически идентифицировать, например, с использованием аланинового сканирующего мутагенеза или моделирования. CDR-H3 и CDR-L3 особенно часто являются целью.

- [0266] В некоторых вариантах осуществления, замены, вставки или делеции можно осуществлять в пределах одного или нескольких HVR, при условии, что такие изменения по существу не уменьшают способность группы антитела связывать антиген. Например, консервативные изменения (например, консервативные замены, как представлено в настоящем описании), которые по существу не уменьшают аффинность связывания,
- 40 можно осуществлять в HVR. Такие изменения могут находиться вне «горячих точек» HVR или SDR. В некоторых вариантах осуществления вариантов последовательностей V_H и V_L , представленных выше, каждая HVR либо не изменена, либо содержит не более чем одну, две или три аминокислотные замены.

- [0267] Полезный способ идентификации остатков или областей группы антитела, которые могут являться мишень для мутагенеза, называют «аланиновым сканирующим мутагенезом», как описано в Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. В этом способе остаток или группу остатков-мишеней (например, заряженных остатков, таких как arg, asp, his, lys и glu) идентифицируют и заменяют нейтральными или отрицательно

заряженными аминокислотами (например, аланином или полиаланином) для определения того, не подвергнуто ли взаимодействию группы антитела с антигеном. Дополнительные замены можно вводить в положения аминокислот, для которых показана функциональная чувствительность к исходным заменам.

5 Альтернативно или дополнительно, можно определять кристаллическую структуру комплекса антиген-группа антитела для идентификации точек контакта между группой антитела и антигеном. Такие контактные остатки и соседние остатки могут быть намечены или исключены в качестве кандидатов для замены. Можно проводить скрининг вариантов для определения того, обладают ли они желательными свойствами.

10 [0268] Вставки аминокислотных последовательностей включают amino- и/или карбокси-концевые слияния, лежащие в диапазоне от одного остатка до полипептидов, содержащих сотни или более остатков, так же как вставки одного или множества аминокислотных остатков внутри последовательности. Примеры концевых вставок включают группу антитела с N-концевым остатком метионина. Другие варианты группы антитела включают слияние N- или C-конца группы антитела с ферментом (например, для ADEPT) или с полипептидом, увеличивающим время полужизни в сыворотке группы антитела.

Производные

20 [0269] В некоторых вариантах осуществления, abTCR в соответствии с любым из abTCR, описанных в настоящем описании, можно далее модифицировать для содержания дополнительных небелковых групп, которые являются известными в данной области и легко доступными. Группы, пригодные для дериватизации abTCR, включают, но без ограничения, водорастворимые полимеры. Неограничивающие примеры водорастворимых полимеров включают, но без ограничения, полиэтиленгликоль (PEG),

25 сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена/малеинового ангидрида, полиаминокислоты (либо гомополимеры, либо случайные сополимеры) и декстран или поли(н-винил пирролидон)

30 полиэтиленгликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимеры полипропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси. Пропионовый альдегид полиэтиленгликоля может иметь преимущества при производстве вследствие его стабильности в воде. Полимер может иметь любую молекулярную массу и может являться разветвленным или неразветвленным. Количество полимеров, присоединенных к abTCR, можно менять, и если присоединяют более одного

35 полимера, то они могут являться одинаковыми или различными молекулами. Как правило, количество и/или тип полимеров, используемых для дериватизации, можно определить на основе нескольких соображений, включая, но без ограничения, конкретные свойства или функции abTCR, подлежащего улучшению, будет ли производное abTCR использовано в терапии в определенных условиях, и т.д.

40 [0270] В некоторых вариантах осуществления, представлены конъюгаты abTCR и небелковой группы, которые можно избирательно нагревать в результате воздействия радиации. В некоторых вариантах осуществления, небелковая группа представляет собой углеродную нанотрубку (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005)). Радиационное излучение может иметь любую длину волны и включает, но без

45 ограничения, длины волн, которые не повреждают обычные клетки, но которые нагревают данную небелковую группу до температуры, при которой клетки, близлежащие к abTCR-небелковой молекуле, погибают.

Получение эффекторных клеток с abTCR

[0271] Настоящее изобретение в одном аспекте относится к эффекторным клеткам (таким как лимфоциты, например, Т-клетки), экспрессирующим abTCR. Иллюстративные способы получения эффекторных клеток (таких как Т-клетки), экспрессирующих abTCR (эффекторных клеток с abTCR, таких как Т-клетки с abTCR), представлены в настоящем описании.

[0272] В некоторых вариантах осуществления, эффекторную клетку с abTCR (такую как Т-клетка с abTCR) можно получать посредством введения одной или нескольких нуклеиновых кислот (включая, например, лентивирусный вектор), кодирующих abTCR (такой, как любой из abTCR, описанных в настоящем описании), специфически связывающий антиген-мишень (такой как ассоциированный с заболеванием антиген), в эффекторную клетку. Введение одной или нескольких нуклеиновых кислот в эффекторную клетку можно осуществлять с использованием способов, известных в данной области, таких как способы, описанные в настоящем описании для нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления, эффекторные клетки с abTCR (такие как Т-клетки с abTCR) по изобретению являются способными к репликации *in vivo*, приводящей к длительной персистенции, которая может приводить к длительному контролю заболевания, ассоциированного с экспрессией антигена-мишени (такого как злокачественная опухоль или вирусная инфекция).

[0273] В некоторых вариантах осуществления, изобретение относится к введению генетически модифицированной Т-клетки, экспрессирующей abTCR, специфически связывающий антиген-мишень в соответствии с любым из abTCR, описанных в настоящем описании, для лечения пациента, имеющего заболевание и/или нарушение или подверженного риску развития заболевания и/или нарушения, ассоциированного с экспрессией антигена-мишени (также обозначенного в настоящем описании как «положительное по антигену-мишени» или «положительное по ТА» заболевание или нарушение), включая, например, злокачественную опухоль или вирусную инфекцию, с использованием инфузии лимфоцитов. В некоторых вариантах осуществления, инфузию аутологичных лимфоцитов используют для лечения. Аутологичные РВМС собирают от пациента, нуждающегося в лечении, и Т-клетки активируют и подвергают размножению с использованием способов, описанных в настоящем описании и известны в данной области, и затем вводят посредством инфузии обратно пациенту.

[0274] Некоторые варианты осуществления относятся к Т-клетке, экспрессирующей abTCR, специфически связывающий антиген-мишень в соответствии с любым из abTCR, описанных в настоящем описании (также обозначенной в настоящем описании как «Т-клетка с abTCR»). Т-клетки с abTCR по изобретению можно подвергать быстрому размножению Т-клеток *in vivo*, и можно получать специфические для антигена-мишени клетки памяти, персистирующие на высоких уровнях в течение длительного периода времени в крови и костном мозге. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки с abTCR по изобретению, введенные посредством инфузии пациенту, могут уничтожать представляющие антиген-мишень клетки, такие как представляющие антиген-мишень злокачественные или инфицированные вирусом клетки, *in vivo* у пациентов, имеющих ассоциированное с антигеном-мишенью заболевание. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки с abTCR по изобретению, введенные посредством инфузии пациенту, могут уничтожать представляющие антиген-мишень клетки, такие как представляющие антиген-мишень злокачественные или инфицированные вирусом клетки, *in vivo* у пациентов, имеющих ассоциированное с антигеном-мишенью заболевание, которое является невосприимчивым по меньшей мере к одному общепринятому лечению.

[0275] Перед размножением и генетической модификацией Т-клеток, источник Т-клеток получают от субъекта. Т-клетки можно получать из ряда источников, включая мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, ткань тимуса, ткань из участка инфекции, асциты, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, можно использовать любое количество линий Т-клеток, доступных в данной области. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, Т-клетки можно получать из дозы крови, отобранной у субъекта, с использованием любого количества способов, известных специалисту в данной области, таких как разделение на фиколле™. В некоторых вариантах осуществления, клетки из циркулирующей крови индивидуума получают посредством афереза. Продукт афереза, как правило, содержит лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядродержащие белые кровяные клетки, эритроциты и тромбоциты. В некоторых вариантах осуществления, клетки, собранные посредством афереза, можно промывать для удаления фракции плазмы и для помещения клеток в подходящий буфер или среду для последующих стадий переработки. В некоторых вариантах осуществления, клетки промывают с использованием фосфатно-солевого буфера (PBS). В некоторых вариантах осуществления, в растворе для промывки отсутствует кальций и может отсутствовать магний, или могут отсутствовать многие, если не все, двухвалентные катионы. Как ясно понятно специалисту в данной области, стадию промывки можно осуществлять способами, известными в данной области, такими как способы с использованием полуавтоматической «проточной» центрифуги (например, устройства для переработки клеток Cobe 2991, Baxter CytoMate или Haemonetics Cell Saver 5), в соответствии с инструкциями производителя. После промывки, клетки можно ресуспендировать во множестве биосовместимых буферов, таких как не содержащий Ca^{2+} , не содержащий Mg^{2+} PBS, PlasmaLyte A или другие солевые растворы с буфером или без. Альтернативно, нежелательные компоненты из образца после афереза можно удалять, и клетки ресуспендировать непосредственно в культуральной среде.

[0276] В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки выделяют из лимфоцитов периферической крови посредством лизиса эритроцитов и истощения моноцитов, например, посредством центрифугирования в градиенте перколл™ или посредством противоточного элютриационного центрифугирования. Специфическую субпопуляцию Т-клеток, например, CD3^+ , CD28^+ , CD4^+ , CD8^+ , CD45RA^+ и CD45RO^+ Т-клетки, можно далее выделять посредством способов положительного или отрицательного отбора. Например, в некоторых вариантах осуществления, Т-клетки выделяют посредством инкубации с бусинами, конъюгированными с антителами против CD3/против CD28 (т.е., 3×28), такими как DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 Т, в течение периода времени, достаточного для положительного отбора желательных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, период времени составляет приблизительно 30 минут. В некоторых вариантах осуществления, период времени лежит в диапазоне от 30 минут до 36 часов или дольше (включая все диапазоны между этими значениями). В некоторых вариантах осуществления, период времени составляет по меньшей мере один, 2, 3, 4, 5 или 6 часов. В некоторых вариантах осуществления, период времени составляет 10-24 часов. В некоторых вариантах осуществления, период времени инкубации составляет 24 часа. Для выделения Т-клеток от пациентов с лейкозом, использование более длительных периодов времени инкубации, таких как 24 часа, может увеличивать выход клеток. Более длительные периоды времени инкубации можно использовать для выделения Т-клеток в любой ситуации, когда присутствует мало Т-клеток по сравнению

с другими типами клеток, например, при выделении инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) из ткани опухоли или от индивидуумов с ослабленной иммунной системой. Кроме того, использование более длительных периодов времени инкубации может увеличивать эффективность связывания CD8⁺ Т-клеток. Таким образом, 5 посредством простого укорочения или удлинения времени Т-клеткам позволяют связываться с бусинами для CD3/CD28, и/или посредством увеличения или уменьшения соотношения бусин к Т-клеткам, можно проводить предпочтительный отбор Т-клеток или против Т-клеток в начале культивирования или в других временных точках в ходе процесса. Кроме того, посредством увеличения или уменьшения соотношения антител 10 против CD3 и/или против CD28 на бусинах или другой поверхности, можно проводить предпочтительный отбор субпопуляций Т-клеток или против субпопуляций Т-клеток в начале культивирования или в других желательных временных точках. Специалисту в данной области понятно, что множество циклов отбора можно также использовать в контексте этого изобретения. В некоторых вариантах осуществления, может являться 15 желательным проводить процедуру отбора и использовать «не отобранные» клетки в способе активация и размножения. «Не отобранные» клетки можно также подвергать дополнительным циклам отбора.

[0277] Обогащение популяции Т-клеток посредством отрицательного отбора можно осуществлять с использованием комбинации антител, нацеленных на поверхностные 20 маркеры, уникальные для подвергаемых отрицательному отбору клеток. Одним из способов является сортировка и/или отбор клеток посредством отрицательной магнитной иммунной адгезии или проточной цитометрии, в которых используют коктейль моноклональных антител, нацеленных на поверхностные маркеры, присутствующие на подвергаемых отрицательному отбору клетках. Например, для 25 обогащения CD4⁺ клеток посредством отрицательного отбора, коктейль моноклональных антител, как правило, содержит антитела против CD14, CD20, CD11b, CD 16, HLA-DR и CD8. В некоторых вариантах осуществления, может являться желательным обогащение или положительный отбор регуляторных Т-клеток, которые, 30 как правило, экспрессируют CD4⁺, CD25⁺, CD62Lhi, GITR⁺ и FoxP3⁺. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления, регуляторные Т-клетки истощают посредством конъюгированных с антителами против CD25 бусин или других сходных способов отбора.

[0278] Для выделения желательной популяции клеток посредством положительного или отрицательного отбора, концентрацию клеток и поверхности (например, частиц, 35 таких как бусины), можно менять. В некоторых вариантах осуществления, может являться желательным значительное уменьшение объема, в котором смешивают бусины и клетки (т.е., увеличение концентрации клеток), для обеспечения максимального контакта клеток и бусин. Например, в некоторых вариантах осуществления, используют концентрацию приблизительно 2 миллиарда клеток/мл. В некоторых вариантах 40 осуществления, используют концентрацию приблизительно 1 миллиард клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления, используют более, чем 100 миллионов клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления, используют концентрацию клеток из любой из приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 миллионов клеток/мл. В некоторых 45 вариантах осуществления, используют концентрацию клеток из любой из приблизительно 75, 80, 85, 90, 95 или 100 миллионов клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления, используют концентрацию приблизительно 125 или приблизительно 150 миллионов клеток/мл. Использование высоких концентраций может приводить к увеличенному выходу клеток, активации клеток и размножению клеток. Кроме того,

использование высоких концентраций клеток позволяет более эффективное связывание клеток, которые могут слабо экспрессировать представляющие интерес антигены-мишени, таких как отрицательные по CD28 Т-клетки, или связывание из образцов, где присутствует множество клеток опухолей (т.е., пораженная лейкозом кровь, ткань опухоли и т.д.). Такие популяции клеток могут иметь терапевтическую ценность, и их получение может являться желательным. Например, использование высокой концентрации клеток позволяет отбор CD8⁺ Т-клеток, которые в норме обладают более слабой экспрессией CD28.

[0279] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, Т-клетки получают от пациента непосредственно после лечения. В этом отношении, наблюдали, что после конкретных видов лечения злокачественных опухолей, в частности, лечения с использованием лекарственных средств, повреждающих иммунную систему, вскоре после лечения, в ходе периода, когда пациенты в норме восстанавливаются после лечения, качество полученных Т-клеток может являться оптимальным или улучшенным по их способности к размножению *ex vivo*. Подобным образом, после манипуляций *ex vivo* с использованием способов, описанных в настоящем описании, эти клетки могут находиться в предпочтительном состоянии для улучшенной трансплантации и размножения *in vivo*. Таким образом, в контексте настоящего изобретения предусматривают сбор клеток крови, включая Т-клетки, дендритные клетки или другие клетки гематопоэтических линий, в ходе фазы их восстановления. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления, мобилизацию (например, мобилизацию с использованием GM-CSF) и режимы кондиционирования можно использовать для создания условий в организме субъекта, при которых репопуляция, рециркуляция, регенерация и/или размножение конкретных типов клеток являются преимущественными, особенно в течение определенного временного окна после терапии. Иллюстративные типы клеток включают Т-клетки, В клетки, дендритные клетки и другие клетки иммунной системы.

[0280] Либо до, либо после генетической модификации Т-клеток для экспрессии желательного *abTCR*, Т-клетки можно активировать и подвергать размножению, в общем, с использованием способов, как описано, например, в Патентах США No. 6352694; 6534055; 6905680; 6692964; 5858358; 6887466; 6905681; 7144575; 7067318; 7172869; 7232566; 7175843; 5883223; 6905874; 6797514; 6867041; и Публикации патентной заявки США No. 20060121005.

[0281] Как правило, Т-клетки по изобретению размножают посредством контакта с поверхностью с присоединенным к ней средством, стимулирующим передачу сигнала, ассоциированного с комплексом CD3/TCR, и лигандом, стимулирующим костимулирующую молекулу на поверхности Т-клеток. В частности, популяции Т-клеток можно стимулировать, например, посредством контакта с антителом против CD3, или его антигенсвязывающим фрагментом, или с антителом против CD2, иммобилизованным на поверхности, или посредством контакта с активатором протеинкиназы С (например, бриостатином) в сочетании с ионофором кальция. Для костимуляции вспомогательной молекулы на поверхности Т-клеток, используют лиганд, который связывается с вспомогательной молекулой. Например, популяцию Т-клеток можно приводить в контакт с антителом против CD28, в условиях, подходящих для стимуляции пролиферации Т-клеток. Для стимуляции пролиферации либо CD4⁺ Т-клеток, либо CD8⁺ Т-клеток, используют антитело против CD3 и антитело против CD28. Примеры антитела против CD28, включающие 9.3, В-Т3, XR-CD28 (Diaclone, Besançon,

France), можно использовать, как можно использовать другие способы, общеизвестные в данной области (Berg et al., *Transplant Proc.* 30(8):3975-3977, 1998; Naanen et al., *J. Exp. Med.* 190(9):1319-1328, 1999; Garland et al., *J. Immunol. Meth.* 227(1-2):53-63, 1999).

[0282] В некоторых из любых таких вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, получение эффекторных клеток с abTCR приводит к минимальному истощению или в основном к отсутствию истощения эффекторных клеток с abTCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, получение приводит менее, чем приблизительно к 50% (например, менее, чем приблизительно к любому из 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 или 5%) истощению эффекторных клеток с abTCR. Истощение эффекторных клеток можно определять любыми способами, известными в данной области, включая любые способы, описанные в настоящем описании.

[0283] В некоторых из любых таких вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, получение эффекторных клеток с abTCR приводит к минимальной терминальной дифференцировке или в основном к отсутствию терминальной дифференцировки эффекторных клеток с abTCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, получение приводит менее, чем приблизительно к 50% (например, менее, чем приблизительно к любому из 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 или 5%) терминальной дифференцировки эффекторных клеток с abTCR. Дифференцировку эффекторных клеток можно определять любыми способами, известными в данной области, включая любые способы, описанные в настоящем описании.

[0284] В некоторых из любых таких вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, получение эффекторных клеток с abTCR приводит к минимальной интернализации или в основном к отсутствию интернализации abTCR на эффекторных клетках с abTCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, получение приводит менее, чем приблизительно к 50% (например, менее, чем приблизительно к любому из 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 или 5%) интернализации abTCR на эффекторных клетках с abTCR. Интернализацию abTCR на эффекторных клетках с abTCR можно определять любыми способами, известными в данной области, включая любые способы, описанные в настоящем описании.

30 Генетическая модификация

[0285] В некоторых вариантах осуществления, эффекторные клетки с abTCR (такие как Т-клетки с abTCR) по изобретению получают посредством трансдукции эффекторных клеток (таких как Т-клетки, полученные способами, описанными в настоящем описании) с использованием вирусного вектора, кодирующего abTCR как описано в настоящем описании. Системы доставки вирусных векторов включают ДНК- и РНК-вирусы, обладающие либо эписомными, либо интегрированными геномами после доставки в эффекторную клетку. Обзор способов генотерапии см. в Anderson, *Science* 256:808-813 (1992); Nabel & Feigner, *TIBTECH* 11:211-217 (1993); Mitani & Caskey, *TIBTECH* 11:162-166 (1993); Dillon, *TIBTECH* 11: 167-175 (1993); Miller, *Nature* 357:455-460 (1992); Van Brunt, *Biotechnology* 6(10): 1149-1 154 (1988); Vigne, *Restorative Neurology and Neuroscience* 8:35-36 (1995); Kremer & Perricaudet, *British Medical Bulletin* 51(1):31-44 (1995); и Yu et al., *Gene Therapy* 1:13-26 (1994). В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор, и эффекторная клетка с abTCR содержит лентивирусный вектор, интегрированный в геном эффекторной клетки с abTCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка с abTCR представляет собой Т-клетку с abTCR, содержащую лентивирусный вектор, интегрированный в ее геном.

[0286] В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка с abTCR представляет собой Т-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения

экспрессии одной или обеих из цепей эндогенного TCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка с abTCR представляет собой $\alpha\beta$ T-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей α и/или β TCR, или эффекторная клетка с abTCR представляет собой $\gamma\delta$ T-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей γ и/или δ TCR. Модификации клеток для нарушения экспрессии гена включают любые такие способы, известные в данной области, включая, например, РНК-интерференцию (например, миРНК, кшРНК, мкРНК), редактирование гена (например, нокаут гена на основе CRISPR или TALEN) и т.п.

[0287] В некоторых вариантах осуществления, T-клетки с abTCR с уменьшенной экспрессией одной или обеих из цепей эндогенного TCR T-клетки получают с использованием системы CRISPR/Cas. Обзор системы редактирования генов CRISPR/Cas, см., например, Jian W & Marraffini LA, Annu. Rev. Microbiol. 69, 2015; Hsu PD et al., Cell, 157(6):1262-1278, 2014; и O'Connell MR et al., Nature 516: 263-266, 2014. В некоторых вариантах осуществления, T-клетки с abTCR с уменьшенной экспрессией одной или обеих из цепей эндогенного TCR T-клетки получают с использованием редактирования генома на основе TALEN.

Обогащение

[0288] Некоторые варианты осуществления относятся к способу обогащения гетерогенной популяции клеток по эффекторным клеткам с abTCR в соответствии с любой из эффекторных клеток с abTCR, описанных в настоящем описании.

[0289] Специфическую субпопуляцию эффекторных клеток с abTCR (таких как T-клетки с abTCR), специфически связывающих антиген-мишень, можно обогащать посредством способов положительного отбора. Например, в некоторых вариантах осуществления, эффекторные клетки с abTCR (такие как T-клетки с abTCR) обогащают посредством инкубации с бусинами, конъюгированными с антигеном-мишенью, в течение периода времени, достаточного для положительного отбора желательных эффекторных клеток с abTCR. В некоторых вариантах осуществления, период времени составляет приблизительно 30 минут. В некоторых вариантах осуществления, период времени лежит в диапазоне от 30 минут до 36 часов или дольше (включая все диапазоны между этими значениями). В некоторых вариантах осуществления, период времени составляет по меньшей мере один, 2, 3, 4, 5 или 6 часов. В некоторых вариантах осуществления, период времени составляет 10-24 часов. В некоторых вариантах осуществления, период времени инкубации составляет 24 часов. Для выделения эффекторных клеток с abTCR, присутствующих на низких уровнях в гетерогенной популяции клеток, использование более длительных периодов времени инкубации, таких как 24 часа, может увеличивать выход клеток. Более длительные периоды времени инкубации можно использовать для выделения эффекторных клеток с abTCR в любой ситуации, когда присутствует мало эффекторных клеток с abTCR по сравнению с другими типами клеток. Специалисту в данной области понятно, что множество циклов отбора можно также использовать в контексте этого изобретения.

[0290] Для выделения желательной популяции эффекторных клеток с abTCR посредством положительного отбора, концентрацию клеток и поверхности (например, частиц, таких как бусины), можно менять. В некоторых вариантах осуществления, может являться желательным значительное уменьшение объема, в котором смешивают бусины и клетки (т.е., увеличение концентрации клеток), для обеспечения максимального контакта клеток и бусин. Например, в некоторых вариантах осуществления, используют концентрацию приблизительно 2 миллиарда клеток/мл. В некоторых вариантах

осуществления, используют концентрацию приблизительно 1 миллиард клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления, используют более, чем 100 миллионов клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления, используют концентрацию клеток из любой из приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 миллионов клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления, используют концентрацию клеток из любой из приблизительно 75, 80, 85, 90, 95 или 100 миллионов клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления, используют концентрацию приблизительно 125 или приблизительно 150 миллионов клеток/мл. Использование высоких концентраций может приводить к увеличенному выходу клеток, активации клеток и размножению клеток. Кроме того, использование высоких концентраций клеток позволяет более эффективное связывание эффекторных клеток с abTCR, которые могут слабо экспрессировать abTCR.

[0291] В некоторых из любых таких вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, обогащение приводит к минимальному истощению или в основном к отсутствию истощения эффекторных клеток с abTCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, обогащение приводит менее, чем приблизительно к 50% (например, менее, чем приблизительно к любому из 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 или 5%) истощению эффекторных клеток с abTCR. Истощение эффекторных клеток можно определять любыми способами, известными в данной области, включая любые способы, описанные в настоящем описании.

[0292] В некоторых из любых таких вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, обогащение приводит к минимальной терминальной дифференцировке или в основном к отсутствию терминальной дифференцировки эффекторных клеток с abTCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, обогащение приводит менее, чем приблизительно к 50% (например, менее, чем приблизительно к любому из 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, или 5%) терминальной дифференцировки эффекторных клеток с abTCR. Дифференцировку эффекторных клеток можно определять любыми способами, известными в данной области, включая любые способы, описанные в настоящем описании.

[0293] В некоторых из любых таких вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, обогащение приводит к минимальной интернализации или в основном к отсутствию интернализации abTCR на эффекторных клетках с abTCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, обогащение приводит менее, чем приблизительно к 50% (например, менее, чем приблизительно любым из 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 или 5%) интернализации abTCR на эффекторных клетках с abTCR. Интернализацию abTCR на эффекторных клетках с abTCR можно определять любыми способами, известными в данной области, включая любые способы, описанные в настоящем описании.

[0294] В некоторых из любых таких вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, обогащение приводит к увеличенной пролиферации эффекторных клеток с abTCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, обогащение приводит к увеличению по меньшей мере приблизительно на 10% (например, по меньшей мере приблизительно на любое из 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 1000% или более) количества эффекторных клеток с abTCR после обогащения.

[0295] Таким образом, некоторые варианты осуществления относятся к способу обогащения гетерогенной популяции клеток по эффекторным клеткам с abTCR, экспрессирующим abTCR, специфически связывающий антиген-мишень, включающему:
а) приведение гетерогенной популяции клеток в контакт с лигандом, содержащим антиген-мишень или один или несколько содержащихся в нем эпитопов, с для

формирования комплексов, содержащих эффекторную клетку с аbTCR, связанным с лигандом; и b) отделение комплексов от гетерогенной популяции клеток, таким образом, получения популяции клеток, обогащенной по эффекторным клеткам с аbTCR. В некоторых вариантах осуществления, лиганд является иммобилизованным на твердой подложке. В некоторых вариантах осуществления, твердая подложка представляет собой частицы (такие как бусины). В некоторых вариантах осуществления, твердая подложка представляет собой поверхность (такую как дно лунки). В некоторых вариантах осуществления, лиганд является меченным с использованием метки. В некоторых вариантах осуществления, метка представляет собой флуоресцентную молекулу, аффинную метку или магнитную метку. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает элюцию эффекторных клеток с аbTCR с лиганда и выделение элюата.

Скрининг библиотек

[0296] Для выделения конструкций-кандидатов аbTCR, специфических для антигена-мишени, библиотеку аbTCR, например, клетки, экспрессирующие библиотеку нуклеиновых кислот, кодирующих множество аbTCR, можно подвергать воздействию лиганда, содержащего антиген-мишень или один или несколько содержащихся в нем эпитопов, с последующим выделением аффинных членов библиотеки, специфически связывающих лиганд. В некоторых вариантах осуществления, лиганд является иммобилизованным на твердой подложке. В некоторых вариантах осуществления, подложка может представлять собой поверхности бусин, планшетов для микротитрования, иммунопробирок или любой материал, известный в данной области, который можно использовать для таких целей. В некоторых вариантах осуществления, взаимодействие имеет место в растворе на меченных лигандах-мишенях (например, биотинилированном лиганде). В некоторых вариантах осуществления, способ включает одну или несколько стадий отмывки для удаления неспецифических и не реакционноспособных членов библиотеки (пэннинг). В некоторых вариантах осуществления, для очистки комплексов в растворе, их связывают либо посредством иммобилизации, либо посредством центрифугирования. В некоторых вариантах осуществления, аффинные члены связывают с растворимым биотинилированным лигандом, с последующей иммобилизацией аффинного комплекса (аффинного члена и лиганда) на стрептавидиновых бусинах. В некоторых вариантах осуществления, твердая подложка представляет собой бусину. В некоторых вариантах осуществления, бусины включают, например, магнитные бусины (например, из Bangs Laboratories, Polysciences inc., Dynal Biotech, Miltenyi Biotech или Quantum Magnetic), немагнитные бусины (например, Pierce и Upstate technology), монодисперсные бусины (например, Dynal Biotech и Microparticle GmbH) и полидисперсные бусины (например, Chemagen). Применение магнитных бусин исчерпывающим образом описано в литературе (Uhlen, M, et al (1994) in Advances in Biomagnetic Separation, BioTechniques press, Westborough, MA). В некоторых вариантах осуществления, аффинные члены очищают посредством положительного отбора. В некоторых вариантах осуществления, аффинные члены очищают посредством отрицательного отбора для удаления нежелательных членов библиотеки. В некоторых вариантах осуществления, аффинные члены очищают посредством стадий как положительного, так и отрицательного отбора.

[0297] Как правило, способы, используемые для получения библиотеки конструкций, основаны на известных способах генной инженерии. С этой целью, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие аbTCR, подлежащие экспрессии в библиотеке, вставляют в экспрессирующие векторы, подходящие для типа системы экспрессии,

подлежащей применению. Подходящие экспрессирующие векторы для использования в дисплее в клетках, таких как CD3+ клетки, являются хорошо известными и описанными в данной области. Например, в некоторых вариантах осуществления, экспрессирующий вектор представляет собой вирусный вектор, такой как лентивирусный вектор.

5 [0298] Некоторые варианты осуществления относятся к библиотеке нуклеиновых кислот, содержащей последовательности, кодирующие множество абTCR в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, библиотека нуклеиновых кислот содержит вирусные векторы, кодирующие множество абTCR. В некоторых вариантах осуществления, вирусные
10 векторы представляют собой лентивирусные векторы.

[0299] Некоторые варианты осуществления относятся к способу скрининга библиотеки нуклеиновых кислот в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, по последовательностям, кодирующим абTCR, специфические для антигена-мишени, включающий: а) введение библиотеки нуклеиновых
15 кислот в множество клеток, так что абTCR экспрессируются на поверхности множества клеток; б) инкубацию множества клеток с лигандом, содержащим антиген-мишень или один или несколько содержащихся в нем эпитопов; с) сбор клеток, связанных с лигандом; и д) выделение последовательностей, кодирующих абTCR, из клеток, собранных на
20 стадии с), таким образом, идентификации абTCR, специфических для антигена-мишени. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает одну или несколько стадий промывки. В некоторых вариантах осуществления, одну или несколько стадий промывки проводят между стадиями б) и с). В некоторых вариантах осуществления, множество клеток представляет собой множество CD3+ клетки. В некоторых вариантах осуществления, лиганд является иммобилизованным на твердой
25 подложке. В некоторых вариантах осуществления, твердая подложка представляет собой бусину. В некоторых вариантах осуществления, сбор клеток, связанных с лигандом включает элюцию клеток с лиганда, связанного с твердой подложкой, и сбор элюата. В некоторых вариантах осуществления, лиганд является меченым с использованием метки. В некоторых вариантах осуществления, метка представляет собой
30 флуоресцентную молекулу, аффинную метку или магнитную метку. В некоторых вариантах осуществления, сбор клеток, связанных с лигандом, включает выделение комплексов, содержащих клетки и меченый лиганд. В некоторых вариантах осуществления, клетки диссоциируют от комплексов.

Белки МНС

35 [0300] Белки МНС класса I представляют собой молекулы одного из двух первичных классов главного комплекса гистосовместимости (МНС) (другим является МНС класса II) и обнаружены почти на каждой ядродержащей клетке организма. Их функцией является экспонирование фрагментов белков из внутреннего содержимого клетки Т-клеткам; здоровые клетки будут проигнорированы, в то время как клетки, содержащие
40 чужеродные или мутантные белки, будут атакованы иммунной системой. Поскольку белки МНС класса I представляют пептиды, происходящие из цитозольных белков, путь представления МНС класса I часто называют цитозольным или эндогенным путем. Молекулы МНС класса I связывают пептиды, полученные в основном в результате деградации цитозольных белков посредством протеасомы. Затем комплекс МНС I:
45 пептид встраивается в плазматическую мембрану клетки. Пептид является связанным с внеклеточной частью молекулы МНС класса I. Таким образом, функцией МНС класса I является представление внутриклеточных белков цитотоксическим Т-клеткам (CTL). Однако, МНС класса I могут также представлять пептиды, полученные из экзогенных

белков, в процессе, известном как перекрестное представление.

[0301] Белки МНС класса I состоят из двух полипептидных цепей, α и β -микроглобулина (β 2M). Две цепи связаны нековалентно посредством взаимодействия β 2M и домена α 3. Только цепь α является полиморфной и кодирована геном HLA, в то время как субъединица β 2M не является полиморфной и кодирована геном β -2 микроглобулина. Домен α 3 пронизывает плазматическую мембрану и взаимодействует с корцептором Т-клеток CD8. Взаимодействие α 3-CD8 удерживает молекулу МНС I на месте, в то время как Т-клеточный рецептор (TCR) на поверхности цитотоксической Т-клетки связывает его гетеродимерный лиганд α 1- α 2 и проверяет объединенный пептид на антигенность. Домены α 1 и α 2 сворачиваются для образования бороздки для связывания пептидов. Белки МНС класса I связывают пептиды, имеющие длину 8-10 аминокислот.

[0302] Молекулы МНС класса II представляют собой семейство молекул, в норме обнаруживаемых только на антигенпредставляющих клетках, таких как дендритные клетки, мононуклеарные фагоциты, некоторые эндотелиальные клетки, эпителиальные клетки тимуса и В-клетки. Антигены, представляемые пептидами класса II, происходят из внеклеточных белков (не цитозольных, как для класса I); таким образом, зависимый от МНС класса II путь представления антигена называют эндоцитозным или экзогенным путем. Нагрузка молекулы МНС класса II происходит посредством фагоцитоза; внеклеточные белки подвергаются эндоцитозу, расщеплению в лизосомах, и полученными эпитопными пептидными фрагментами нагружаются молекулы МНС класса II перед их миграцией к клеточной поверхности.

[0303] Подобно молекулам МНС класса I, молекулы класса II также представляют собой гетеродимеры, но в этом случае состоят из двух гомогенных пептидов, цепи α и β . Обозначение низшего порядка α 1, α 2 и т.д. относится к отдельным доменам в гене HLA; каждый домен обычно кодирован отличным экзоном в гене, и некоторые гены имеют дополнительные домены, кодирующие лидерные последовательности, трансмембранные последовательности и т.д. Поскольку антиген-связывающая бороздка молекул МНС класса II является открытой с обоих концов, в то время как соответствующая бороздка на молекулах класса I закрыта с каждого конца, антигены, представляемые молекулами МНС класса II, являются более длинными, как правило, длиной между 15 и 24 аминокислотных остатков.

[0304] Гены лейкоцитарных антигенов человека (HLA) представляют собой человеческий вариант генов МНС. Три мажорными белками МНС класса I у человека являются HLA-A, HLA-B и HLA-C, в то время как 3 минорными белками являются HLA-E, HLA-F и HLA-G. Три мажорными белками МНС класса II, вовлеченными в представление антигена у человека, являются HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR, в то время как другие белки МНС класса II, HLA-DM и HLA-DO, вовлечены во внутренний процессинг и нагрузку антигенов. HLA-A ранжированы среди генов человека с наиболее быстро эволюционирующей кодирующей последовательностью. На декабрь 2013 г., существовало 2432 известных аллелей HLA-A, кодирующих 1740 активных белков и 117 нулевых белков. Ген HLA-A локализован на коротком плече хромосомы 6 и кодирует более крупную, α -цепь, составляющую HLA-A. Вариабельность α -цепи HLA-A является ключевой для функции HLA. Эта вариабельность способствует генетическому разнообразию в популяции. Поскольку каждый HLA обладает отличной аффинностью для пептидов конкретной структуры, большее разнообразие HLA означает большее разнообразие антигенов, подлежащих «представлению» на клеточной поверхности, увеличивая вероятность того, что подгруппа популяции будет устойчивой к любому

данному чужеродному возбудителю. Это уменьшает вероятность того, что единственный патоген будет обладать способностью уничтожения всей человеческой популяции.

Каждый индивидуум может экспрессировать вплоть до двух типов HLA-A, по одному от каждого из его родителей. Некоторые индивидуумы могут наследовать одинаковый HLA-A от обоих родителей, уменьшая их индивидуальное разнообразие HLA; однако, большинство индивидуумов будут получать две различные копии HLA-A. Этой же самой картине следуют все группы HLA. Иными словами, индивидуум может экспрессировать только либо один, либо два из 2432 известных аллелей HLA-A.

[0305] Все аллели получают по меньшей мере четырехзначную классификацию, например, HLA-A*02:12. А указывает, к какому гену HLA принадлежит аллель. Существует множество аллелей HLA-A, так что классификация по серотипу упрощает категоризацию. Следующая пара цифр указывает на это приписывание. Например, HLA-A*02:02, HLA-A*02:04 и HLA-A*02:324 все являются членами серотипа A2 (обозначенного префиксом *02). Эта группа является первичным фактором, ответственным за совместимость HLA. Все номера после этого невозможно определить посредством серотипирования, и их обозначают посредством секвенирования генов. Второй набор цифр показывает, какой белок HLA продуцируется. Они назначены в порядке открытия, и на декабрь 2013 г. существовало 456 известных различных белков HLA-A02 (с назначенными наименованиями от HLA-A*02:01 до HLA-A*02:456). Самое короткое из возможных наименований HLA включает обе из этих деталей. Каждое удлинение после этого показывает изменение нуклеотида, которое может изменять или может не изменять белок.

[0306] В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль специфически связывается с комплексом, содержащим пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген), и белок MHC класса I, где белок MHC класса I представляет собой HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F или HLA-G. В некоторых вариантах осуществления, белок MHC класса I представляет собой HLA-A, HLA-B или HLA-C. В некоторых вариантах осуществления, белок MHC класса I представляет собой HLA-A. В некоторых вариантах осуществления, белок MHC класса I представляет собой HLA-B. В некоторых вариантах осуществления, белок MHC класса I представляет собой HLA-C. В некоторых вариантах осуществления, белок MHC класса I представляет собой HLA-A01, HLA-A02, HLA-A03, HLA-A09, HLA-A10, HLA-A11, HLA-A19, HLA-A23, HLA-A24, HLA-A25, HLA-A26, HLA-A28, HLA-A29, HLA-A30, HLA-A31, HLA-A32, HLA-A33, HLA-A34, HLA-A36, HLA-A43, HLA-A66, HLA-A68, HLA-A69, HLA-A74 или HLA-A80. В некоторых вариантах осуществления, белок MHC класса I представляет собой HLA-A02. В некоторых вариантах осуществления, белок MHC класса I представляет собой любой из HLA-A*02:01-555, такой как HLA-A*02:01, HLA-A*02:02, HLA-A*02:03, HLA-A*02:04, HLA-A*02:05, HLA-A*02:06, HLA-A*02:07, HLA-A*02:08, HLA-A*02:09, HLA-A*02:10, HLA-A*02:11, HLA-A*02:12, HLA-A*02:13, HLA-A*02:14, HLA-A*02:15, HLA-A*02:16, HLA-A*02:17, HLA-A*02:18, HLA-A*02:19, HLA-A*02:20, HLA-A*02:21, HLA-A*02:22 или HLA-A*02:24. В некоторых вариантах осуществления, белок MHC класса I представляет собой HLA-A*02:01. HLA-A*02:01 экспрессирован у 39-46% из всех европеоидов, и таким образом, представляет собой подходящий выбор белка MHC класса I для применения по настоящему изобретению.

[0307] В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль специфически связывается с комплексом, содержащим пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный

или кодируемый вирусом антиген), и белок МНС класса II, где белок МНС класса II представляет собой HLA-DP, HLA-DQ или HLA-DR. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса II представляет собой HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса II представляет собой HLA-DQ. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса II представляет собой HLA-DR.

[0308] Пептиды, пригодные для использования в получении подобных Fab антигенсвязывающих модулей, можно определять, например, на основании присутствия мотивов связывания HLA (такого как HLA-A*02:01) и участков расщепления для протеасом и иммунопротеасом с использованием компьютерных моделей прогнозирования, известных специалистам в данной области. Для прогнозирования участков связывания МНС, такие модели включают, но без ограничения, ProPred1 (более подробно описанную в Singh and Raghava, ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. BIOINFORMATICS 17(12):1236-1237, 2001), и SYFPEITHI (см. Schuler et al. SYFPEITHI, Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction. in Immunoinformatics Methods in Molecular Biology, vol 409(1): 75-93, 2007).

[0309] После идентификации подходящих пептидов, пептидный синтез можно выполнять в соответствии со способами, хорошо известными специалистам в данной области. Из-за их относительно небольшого размера, пептиды по изобретению можно напрямую синтезировать в растворе или на твердой подложке в соответствии с общепринятыми способами пептидного синтеза. Различные автоматические синтезаторы являются коммерчески доступными и могут быть использованы в соответствии с известными способами. Синтез пептидов в растворенной фазе стал хорошо разработанным способом для крупномасштабной продукции синтетических пептидов и, таким образом, пригодным альтернативным способом получения пептидов по изобретению (См., например, Solid Phase Peptide Synthesis от John Morrow Stewart и Martin et al. Application of Almez-mediated Amidation Reactions to Solution Phase Peptide Synthesis, Tetrahedron Letters Vol. 39, pages 1517-1520, 1998).

Фармацевтические композиции

[0310] Настоящее изобретение относится также к композициям (таким как фармацевтические композиции, также обозначенные в настоящем описании как составы), содержащим abTCR в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, нуклеиновую кислоту, кодирующую abTCR в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, или эффекторную клетку с abTCR в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, композиция представляет собой композицию эффекторной клетки с abTCR (такую как фармацевтическая композиция), содержащую эффекторную клетку (такую как Т-клетка), представляющую на своей поверхности abTCR в соответствии с любым из abTCR, описанных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, композиция эффекторной клетки с abTCR представляет собой фармацевтическую композицию.

[0311] Композиция может содержать гомогенную популяцию клеток, содержащую эффекторные клетки с abTCR из одного и того же типа клеток и экспрессирующие одинаковый abTCR, или гетерогенную популяцию клеток, содержащую множество популяций эффекторных клеток с abTCR, содержащих эффекторные клетки с abTCR из различных типов клеток и/или экспрессирующих различные abTCR. Композиция может дополнительно содержать клетки, не являющиеся эффекторными клетками с abTCR.

[0312] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, представлена

композиция эффекторной клетки с abTCR, содержащая гомогенную популяцию клеток из эффекторных клеток с abTCR (таких как Т-клетки с abTCR) из одного и того же типа клеток и экспрессирующие одинаковый abTCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка с abTCR представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка с abTCR выбрана из группы, состоящей из цитотоксической Т-клетки, Т-клетки-помощника, Т-клетки - естественного киллера и супрессорной Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, композиция эффекторной клетки с abTCR представляет собой фармацевтическую композицию.

[0313] В некоторых вариантах осуществления, представлена композиция эффекторной клетки с abTCR, содержащая гетерогенную популяцию клеток, содержащую множество популяций эффекторных клеток с abTCR, содержащих эффекторные клетки с abTCR из различных типов клеток и/или экспрессирующих различные abTCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторные клетки с abTCR представляют собой Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, каждая популяция эффекторных клеток с abTCR состоит из типа клеток, выбранных из группы, состоящей из цитотоксических Т-клеток, Т-клеток-помощников, Т-клеток - естественных киллеров и супрессорных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, все из эффекторных клеток с abTCR в композиции относятся к одному и тому же типу клеток (например, все эффекторные клетки с abTCR представляют собой цитотоксические Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна популяция эффекторных клеток с abTCR относится к отличному от других типу клеток (например, одна популяция эффекторных клеток с abTCR состоит из цитотоксических Т-клеток, и другие популяции эффекторных клеток с abTCR состоят из Т-клеток - естественных киллеров). В некоторых вариантах осуществления, каждая популяция эффекторных клеток с abTCR экспрессирует один и тот же abTCR. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна популяция эффекторных клеток с abTCR экспрессирует отличный от других abTCR. В некоторых вариантах осуществления, каждая популяция эффекторных клеток с abTCR экспрессирует отличный от других abTCR. В некоторых вариантах осуществления, каждая популяция эффекторных клеток с abTCR экспрессирует abTCR, специфически связывающий один и тот же антиген-мишень. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна популяция эффекторных клеток с abTCR экспрессирует abTCR, специфически связывающий отличный от других антиген-мишень (например, одна популяция эффекторных клеток с abTCR специфически связывается с комплексом пМНС и другие популяции эффекторных клеток с abTCR специфически связываются с рецептором клеточной поверхности). В некоторых вариантах осуществления, где по меньшей мере одна популяция эффекторных клеток с abTCR экспрессирует abTCR, специфически связывающий отличный антиген-мишень, каждая популяция эффекторных клеток с abTCR экспрессирует abTCR, специфически связывающий антиген-мишень, ассоциированный с одним и тем же заболеванием или нарушением (например, каждый из антигенов-мишеней ассоциирован с злокачественной опухолью, такой как рак молочной железы). В некоторых вариантах осуществления, композиция эффекторной клетки с abTCR представляет собой фармацевтическую композицию.

[0314] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, представлена композиция эффекторной клетки с abTCR, содержащая множество популяций эффекторных клеток с abTCR в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, где все эффекторные клетки с abTCR в композиции относятся к одному и тому же типу клеток (например, все эффекторные клетки с abTCR представляют собой цитотоксические Т-клетки), и где каждая популяция эффекторных

клеток с abTCR экспрессирует отличный от других abTCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторные клетки с abTCR представляют собой Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, эффекторные клетки с abTCR выбраны из группы, состоящей из цитотоксических Т-клеток, Т-клеток-помощников, Т-клеток - естественных киллеров и супрессорных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, каждая популяция эффекторных клеток с abTCR экспрессирует abTCR, специфически связывающий один и тот же антиген-мишень. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна популяция эффекторных клеток с abTCR экспрессирует abTCR, специфически связывающий отличный от других антиген-мишень (например, одна популяция эффекторных клеток с abTCR специфически связывается с комплексом пМНС, и другие популяции эффекторных клеток с abTCR специфически связываются с рецептором клеточной поверхности). В некоторых вариантах осуществления, где по меньшей мере одна популяция эффекторных клеток с abTCR экспрессирует abTCR, специфически связывающий отличный антиген-мишень, каждая популяция эффекторных клеток с abTCR экспрессирует abTCR, специфически связывающий антиген-мишень, ассоциированный с одним и тем же заболеванием или нарушением (например, каждый из антигенов-мишеней ассоциирован с злокачественной опухолью, такой как рак молочной железы). В некоторых вариантах осуществления, композиция эффекторной клетки с abTCR представляет собой фармацевтическую композицию.

[0315] Некоторые варианты осуществления относятся к композиции, содержащей множество популяций эффекторных клеток с abTCR в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, где по меньшей мере одна популяция эффекторных клеток с abTCR относится к отличному от других типу клеток. В некоторых вариантах осуществления, все из популяций эффекторных клеток с abTCR относятся к различным типам клеток. В некоторых вариантах осуществления, эффекторные клетки с abTCR представляют собой Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, каждая популяция эффекторных клеток с abTCR состоит из типа клеток, выбранных из группы, состоящей из цитотоксических Т-клеток, Т-клеток-помощников, Т-клеток - естественных киллеров и супрессорных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, каждая популяция эффекторных клеток с abTCR экспрессирует один и тот же abTCR. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна популяция эффекторных клеток с abTCR экспрессирует отличный от других abTCR. В некоторых вариантах осуществления, каждая популяция эффекторных клеток с abTCR экспрессирует отличный от других abTCR. В некоторых вариантах осуществления, каждая популяция эффекторных клеток с abTCR экспрессирует abTCR, специфически связывающий один и тот же антиген-мишень. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна популяция эффекторных клеток с abTCR экспрессирует abTCR, специфически связывающий отличный от других антиген-мишень (например, одна популяция эффекторных клеток с abTCR специфически связывается с комплексом пМНС, и другие популяции эффекторных клеток с abTCR специфически связываются с рецептором клеточной поверхности). В некоторых вариантах осуществления, где по меньшей мере одна популяция эффекторных клеток с abTCR экспрессирует abTCR, специфически связывающий отличный антиген-мишень, каждая популяция эффекторных клеток с abTCR экспрессирует abTCR, специфически связывающий антиген-мишень, ассоциированный с одним и тем же заболеванием или нарушением (например, каждый из антигенов-мишеней ассоциирован с злокачественной опухолью, такой как рак молочной железы). В некоторых вариантах осуществления, композиция эффекторной клетки с abTCR представляет собой фармацевтическую композицию.

[0316] В различных точках в ходе получения композиции, может являться необходимым или преимущественным криоконсервирование клеток. Термины «замороженный/замораживание» и «криоконсервированный/криоконсервирование» можно использовать взаимозаменяемо. Замораживание включает лиофилизацию.

5 [0317] Как понятно специалисту в данной области, замораживание клеток может являться повреждающим (см. Mazur, P., 1977, *Cryobiology* 14:251-272), но существует множество способов, доступных для предотвращения такого повреждения. Например, повреждения можно избегать посредством (а) применения криопротективного средства, (b) контроля скорости замораживания и/или (с) хранение при температуре, достаточно
10 низкой для минимизации реакций деградаци. Иллюстративные криопротективные средства включают диметилсульфоксид (DMSO) (Lovelock and Bishop, 1959, *Nature* 183: 1394-1395; Ashwood-Smith, 1961, *Nature* 190:1204-1205), глицерин, поливинилпирролидин (Rinfret, 1960, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 85:576), полиэтиленгликоль (Sloviter and Ravdin, 1962, *Nature* 196:548), альбумин, декстран, сахарозу, этиленгликоль, i-эритрит, D-рибит, D-маннит (Rowe et al., 1962, *Fed. Proc.* 21:157), D-сорбит, i-инозитол, D-лактозу, хлорид холина (Bender et al., 1960, *J. Appl. Physiol.* 15:520), аминокислоты (Phan The Tran and Bender, 1960, *Exp. Cell Res.* 20:651), метанол, ацетамид, моноацетат глицерина (Lovelock, 1954, *Biochem. J.* 56:265) и неорганические соли (Phan The Tran and Bender, 1960, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 104:388; Phan The Tran and Bender, 1961, in *Radiobiology, Proceedings of the Third Australian Conference on Radiobiology*, Ilbery ed., Butterworth, London, p. 59). В
20 конкретных вариантах осуществления, можно использовать DMSO. Добавление плазмы (например, до концентрации 20-25%) может усиливать защитные эффекты DMSO. После добавления DMSO, клетки можно хранить при 0°C до замораживания, поскольку концентрации DMSO 1% могут являться при температурах выше 4°C.

25 [0318] При криоконсервировании клеток, низкие контролируемые скорости охлаждения могут являться критическими, и различные криопротективные средства (Rapatz et al., 1968, *Cryobiology* 5(1): 18-25) и различные типы клеток обладают различными скоростями охлаждения (см., например, в Rowe and Rinfret, 1962, *Blood* 20: 636; Rowe, 1966, *Cryobiology* 3(1):12-18; Lewis, et al., 1967, *Transfusion* 7(1):17-32; и Mazur, 30 1970, *Science* 168:939-949 эффекты скорости охлаждения на выживаемость стволовых клеток и на их трансплантационный потенциал). Нагревание расплавленной фазы, где вода превращается в лед, должно быть минимальным. Процедуру охлаждения можно проводить посредством применения, например, программируемого устройства для замораживания или способа метанольной бани. Программируемые устройства для
35 замораживания обеспечивают оптимальные скорости охлаждения и облегчают стандартное воспроизводимое охлаждение.

[0319] В конкретных вариантах осуществления, обработанные DMSO клетки можно предварительно охлаждать на льду и переносить в лоток, содержащий охлажденный метанол, который помещают, в свою очередь, в холодильник с механической системой
40 охлаждения (например, Harris или Revco) при -80°C. Измерение в метанольной бане с помощью термодпары, и образцы, для которых показана скорость охлаждения 1°-3°C/минуту, могут являться предпочтительными. Через по меньшей мере два часа, образцы могут достигать температуры - 80°C, и их можно помещать непосредственно в жидкий азот (-196°C).

45 [0320] После тщательного замораживания, клетки можно быстро переносить в сосуд для длительного криогенного хранения. В предпочтительном варианте осуществления, образцы можно подвергать криогенному хранению в жидком азоте (-196°C) или парах (-1°C). Такое хранение облегчается при доступности высокоэффективных азотных

холодильников.

[0321] Дополнительные соображения и способы для манипуляций, криоконсервирования и длительного хранения клеток, можно обнаружить в следующих иллюстративных ссылках: Патенты США No. 4199022; 3753357; и 4559298; Gorin, 1986, Clinics In Haematology 15(1):19-48; Bone-Marrow Conservation, Culture and Transplantation, Proceedings of a Panel, Moscow, July 22-26, 1968, International Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 107- 186; Livesey and Linner, 1987, Nature 327:255; Linner et al., 1986, J. Histochem. Cytochem. 34(9):1 123-1 135; Simione, 1992, J. Parenter. Sci. Technol. 46(6):226-32).

[0322] После криоконсервирования, замороженные клетки можно размораживать для использования в соответствии со способами, известными специалистам в данной области. Замороженные клетки предпочтительно быстро размораживают и охлаждают немедленно после размораживания. В конкретных вариантах осуществления, ампулу, содержащую замороженные клетки, можно погружать вплоть до горлышка в теплую водяную баню; осторожное переворачивание может обеспечивать перемешивание суспензии клеток по мере их размораживания и увеличивает передачу тепла от теплой воды к внутренней ледяной массе. Как только лед полностью расплавится, ампулу можно немедленно помещать в лед.

[0323] В конкретных вариантах осуществления, способы можно использовать для предотвращения слеживания клеток после размораживания. Иллюстративные способы включают: добавление до и/или после замораживания ДНКазы (Spitzer et al., 1980, Cancer 45:3075-3085), низкомолекулярного декстрана и цитрата, гидроксипропилкрахмала (Stiff et al., 1983, Cryobiology 20:17-24) и т.д. [0162] Как понятно специалисту в данной области, если используют криопротективное средство, которое является токсичным для человека, его следует удалять до терапевтического применения. DMSO не обладает серьезной токсичностью.

[0324] Иллюстративные носители и способы введения клеток описаны на страницах 14-15 Публикации патента США No. 2010/0183564. Дополнительные фармацевтические носители описаны в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21 st Edition, David B. Troy, ed., Lippicott Williams & Wilkins (2005).

[0325] В конкретных вариантах осуществления, клетки можно собирать из культуральной среды, и промывать и концентрировать в носителе в терапевтически эффективном количестве. Иллюстративные носители включают солевой раствор, забуференный солевой раствор, физиологический солевой раствор, воду, раствор Хэнкса, раствор Рингера, Nonnosol-R (Abbott Labs), Plasma-Lyte A(R) (Baxter Laboratories, Inc., Morton Grove, IL), глицерин, этанол и их комбинации.

[0326] В конкретных вариантах осуществления, носители можно дополнять человеческим сывороточным альбумином (HSA) или другими компонентами человеческой сыворотки или эмбриональной бычьей сыворотки. В конкретных вариантах осуществления, носитель для инфузии включает забуференный солевой раствор с 5% HSA или декстрозой. Дополнительные изотонические средства включают многоатомные сахарные спирты, включая трехатомные сахарные спирты или сахарные спирты с более высокой атомностью, такие как глицерин, эритрит, арабит, ксилит, сорбит или маннит.

[0327] Носители могут включать забуферивающие средства, такие как цитратные буферы, сукцинатные буферы, тартратные буферы, фумаратные буферы, глюконатные буферы, оксалатные буферы, лактатные буферы, ацетатные буферы, фосфатные буферы, гистидиновые буферы и/или триметиламиновые соли.

[0328] Стабилизаторы относятся к широкой категории наполнителей, функции

которых могут лежать в диапазоне от придающего объем средства до добавки, помогающей предотвращать адгезию клеток к стенкам контейнера. Типичные стабилизаторы могут включать многоатомные сахарные спирты; аминокислоты, такие как аргинин, лизин, глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аланин, орнитин, L-лейцин, 2- фенилаланин, глутаминовая кислота и треонин; органические сахара или сахарные спирты, такие как лактоза, трегалоза, стахиоза, маннит, сорбит, ксилит, рибит, миоинозитол, галактит, глицерин, и циклитолы, такие как инозитол; PEG; аминокислотные полимеры; содержащие серу восстанавливающие средства, такие как мочевины, глутатион, тиоктовая кислота, тиогликолят натрия, тиоглицерин, альфа-монотиоглицерин и тиосульфат натрия; низкомолекулярные полипептиды (т.е., <10 остатков); белки, такие как HSA, бычий сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; моносахариды, такие как ксилоза, манноза, фруктоза и глюкоза; дисахариды, такие как лактоза, мальтоза и сахароза; трисахариды, такие как рафиноза, и полисахариды, такие как декстран.

[0329] Когда это является необходимым или преимущественным, композиции могут включать местный анестетик, такой как лидокаин, для облегчения боли в участке инъекции.

[0330] Иллюстративные консерванты включают фенол, бензиловый спирт, метакрезол, метилпарабен, пропилпарабен, хлорид октадецилдиметилбензиламмония, галогениды бензалкония, хлорид гексаметэтония, алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен, катехол, резорцинол, циклогексанол и 3-пентанол.

[0331] Терапевтически эффективные количества клеток в композициях могут составлять более чем 10^2 клеток, более чем 10^3 клеток, более чем 10^4 клеток, более чем 10^5 клеток, более чем 10^6 клеток, более чем 10^7 клеток, более чем 10^8 клеток, более чем 10^9 клеток, более чем 10^{10} клетки или более чем 10^{11} клеток.

[0332] В композициях и составах, описанных в настоящем описании, клетки, как правило, находятся в объеме литра или менее, 500 мл или менее, 250 мл или менее или 100 мл или менее. Таким образом, плотность вводимых клеток, как правило, превышает 10^4 клеток/мл, 10^7 клеток/мл или 10^8 клеток/мл.

[0333] Настоящее изобретение относится также к композициям нуклеиновых кислот абTCR (таким как фармацевтические композиции, также обозначенные в настоящем описании как составы), содержащим любые из нуклеиновых кислот, кодирующих абTCR, описанные в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, композиция нуклеиновых кислот абTCR представляет собой фармацевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления, композиция нуклеиновых кислот абTCR дополнительно содержит любое из придающего изотоничность средства, наполнителя, разбавителя, загустителя, стабилизатора, буфера и/или консерванта; и/или водного носителя, такого как очищенная вода, водный раствор сахара, буферный раствор, физиологический солевой раствор, водный раствор полимера или не содержащей РНКазы воды. Количество таких добавок и водных носителей, подлежащих добавке, можно подходящим образом выбирать в соответствии с формой применения композиции нуклеиновых кислот абTCR.

[0334] Композиции и составы, описанные в настоящем описании, можно получать для введения, например, посредством инъекции, инфузии, перфузии или лаважа. Композиции и составы можно дополнительно составлять для инъекции в костный мозг, внутривенной, внутрикожной, внутриартериальной, внутриузловой,

внутрилимфатической, внутрибрюшинной, внутриочаговой инъекции, инъекции в предстательную железу, интравагинальной, ректальной, местной, интратекальной, внутриопухолевой, внутримышечной, внутрипузырной и/или подкожной инъекции.

[0335] Составы, предназначенные для применения для введения *in vivo*, должны 5 являться стерильными. Этого легко достигают, например, посредством фильтрации через мембраны для стерильной фильтрации.

Способы лечения с использованием abTCR

[0336] abTCR и/или композиции по изобретению можно вводить индивидуумам (например, млекопитающим, таким как человек) для лечения заболевания и/или 10 нарушения, ассоциированного с экспрессией антигена-мишени (ТА) (также обозначенного в настоящем описании как «положительное по антигену-мишени» или «положительное по ТА» заболевание или нарушение), включая, например, злокачественную опухоль и инфекционное заболевание (такое как вирусная инфекция). Настоящая заявка, таким образом, в некоторых вариантах осуществления относится 15 к способу лечения положительного по антигену-мишени заболевания (такого как злокачественная опухоль или вирусная инфекция) у индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества композиции (такой как фармацевтическая композиция), содержащей abTCR, содержащий группу антитела, такой как любой из abTCR, описанных в настоящем описании. В некоторых вариантах 20 осуществления, композиция дополнительно содержит клетку (такую как эффекторная клетка), ассоциированную с abTCR. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль выбрана, например, из группы, состоящей из аденокарциномы, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака шейки матки, холангиокарциномы, колоректального рака, рака пищевода, 25 глиобластомы, глиомы, печеночно-клеточной карциномы, рака головы и шеи, рака почки, рака легкого, меланомы, мезотелиомы, множественной миеломы, рака поджелудочной железы, феохромоцитомы, плазмацитомы, нейробластомы, рака яичника, рака предстательной железы, саркомы, рака желудка, рака тела матки и рака щитовидной железы. В некоторых вариантах осуществления, вирусная инфекция вызвана 30 вирусом, выбранным, например, из группы состоящий из цитомегаловируса (CMV), вируса Эпштейна-Барр (EBV), вируса гепатита В (HBV), ассоциированного с саркомой Капоши вируса герпеса (KSHV), вируса папилломы человека (HPV), вируса контагиозного моллюска (MCV), вируса Т-клеточного лейкоза человека (HTLV-1), HIV (вируса иммунодефицита человека) и вируса гепатита С (HCV).

[0337] Например, в некоторых вариантах осуществления, представлен способ лечения 35 ассоциированного с антигеном-мишенью заболевания (такого как злокачественная опухоль или вирусная инфекция) у нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей эффекторные клетки (такие как Т-клетки или клетки естественные киллеры), представляющие на 40 своей поверхности abTCR (такой как выделенный abTCR), содержащий а) подобный Fab антигенсвязывающий модуль, специфически связывающий антиген-мишень, и б) TCRM, способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль содержит домен V_H антитела, домен C_{H1} антитела, домен 45 V_L антитела и домен C_L антитела. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным, химерным, полусинтетическим или полностью синтетическим. В некоторых вариантах осуществления, TCRM содержит трансмембранные домены TCR, такого как αβTCR

или $\gamma\delta$ TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCRM дополнительно содержит соединительные пептиды или их фрагменты из TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCRM дополнительно содержит по меньшей мере одну часть внеклеточного домена TCR. В некоторых вариантах осуществления, abTCR

5 дополнительно содержит по меньшей мере один внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один внутриклеточный домен содержит любую из последовательности внутриклеточного домена TCR, костимулирующей

10 внутриклеточной передающей сигналы последовательности, эпитопа-метки или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере одну дисульфидную связь. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль содержит дисульфидную связь, и/или TCRM

15 содержит дисульфидную связь. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль содержит дисульфидную связь между остатком в домене CN1 и остатком в домене CL, и/или TCRM содержит дисульфидную связь между остатком

20 в первом соединительном пептиде и остатком во втором соединительном пептиде. В некоторых вариантах осуществления, TCRM является способным привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль, выбранный из группы, состоящей из CD3 δ ϵ , CD3 γ ϵ и ζ ζ . В некоторых вариантах осуществления, TCRM способствует формированию комплекса abTCR-CD3. В некоторых вариантах

25 осуществления, присутствует пептидный линкер между подобным Fab антигенсвязывающим модулем и TCRM. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой антиген клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности выбран из группы, состоящей из белка, углевода и липида. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной

30 поверхности представляет собой ассоциированный с заболеванием антиген, такой как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой CD19, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D или FCRL5. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень

35 представляет собой представленный на поверхности комплекс пептид/МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген), и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления, способ приводит к минимальному истощению или в основном к отсутствию истощения

40 эффекторных клеток с abTCR. В некоторых вариантах осуществления, способ приводит к минимальной терминальной дифференцировке или в основном к отсутствию терминальной дифференцировки эффекторных клеток с abTCR. В некоторых вариантах осуществления, способ приводит к минимальной интернализации или в основном к отсутствию интернализации abTCR на эффекторных клетках с abTCR. В некоторых вариантах осуществления, способ приводит к увеличенной пролиферации эффекторных

[0338] Некоторые варианты осуществления относятся к способу лечения ассоциированного с антигеном-мишенью заболевания (такого как злокачественная опухоль или вирусная инфекция) у нуждающегося в этом индивидуума, включающему

45 введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей эффекторные клетки (такие как Т-клетки или клетки естественные киллеры), представляющие на своей поверхности abTCR (такой как выделенный abTCR), содержащий а) подобный Fv антигенсвязывающий модуль, специфически связывающий антиген-мишень, и б) TCRM, способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий

сигналы модуль, где антиген-мишень представляет собой комплекс пептид/МНС. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fv антигенсвязывающий модуль содержит домен V_H антитела и домен V_L антитела. В некоторых вариантах осуществления, присутствует первый пептидный линкер, слитый с С-концом домена V_L антитела, и/или второй пептидный линкер, слитый с С-концом домена V_H антитела. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй пептидные линкеры способны связываться друг с другом. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры происходят из константных областей тяжелой и/или легкой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры происходят из константных областей субъединицы TCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры происходят из а) константных доменов субъединицы α и β TCR; или б) константных доменов субъединицы γ и δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры являются синтетическими. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fv антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным, химерным, полусинтетическим или полностью синтетическим. В некоторых вариантах осуществления, TCRM содержит трансмембранные домены TCR, такого как $\alpha\beta$ TCR или $\gamma\delta$ TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCRM дополнительно содержит соединительные пептиды или их фрагменты из TCR, такого как $\alpha\beta$ TCR или $\gamma\delta$ TCR. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранные домены и соединительные пептиды происходят из $\alpha\beta$ TCR или $\gamma\delta$ TCR. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранные домены происходят из $\alpha\beta$ TCR, и соединительные пептиды происходят из $\gamma\delta$ TCR, или трансмембранные домены происходят из $\gamma\delta$ TCR и соединительные пептиды происходят из $\alpha\beta$ TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCRM дополнительно содержит по меньшей мере одну часть внеклеточного домена TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCRM дополнительно содержит по меньшей мере один внутриклеточный домен TCR, содержащий последовательность из внутриклеточного домена TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCRM содержит фрагменты субъединиц TCR. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий T-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или тус). В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого антигенсвязывающего домена и/или второй сигнальный пептид с amino-конца от второго антигенсвязывающего домена. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере одну дисульфидную связь. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй пептидные линкеры содержат дисульфидную связь, и/или TCRM содержит дисульфидную связь. В некоторых вариантах осуществления, TCRM содержит дисульфидную связь между остатком в первом соединительном пептиде и остатком во втором соединительном пептиде. В некоторых вариантах осуществления, TCRM является способным привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль выбранный из группы, состоящей из CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\zeta\epsilon$ и $\zeta\zeta$. В некоторых вариантах осуществления, TCRM способствует формированию комплекса abTCR-CD3. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид антигена-мишени/МНС содержит пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген), и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления,

комплекс пептид/МНС содержит пептид и белок МНС, где пептид происходит из белка, выбранного из группы, состоящей из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1 и PSA. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС представляет собой белок МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-A. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A представляет собой HLA-A02. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A02 представляет собой HLA-A*02:01. В некоторых вариантах осуществления, способ приводит к минимальному истощению или в основном к отсутствию истощения эффекторных клеток с abTCR. В некоторых вариантах осуществления, способ приводит к минимальной терминальной дифференцировке или в основном к отсутствию терминальной дифференцировки эффекторных клеток с abTCR. В некоторых вариантах осуществления, способ приводит к минимальной интернализации или в основном к отсутствию интернализации abTCR на эффекторных клетках с abTCR. В некоторых вариантах осуществления, способ приводит к увеличенной пролиферации эффекторных клеток с abTCR.

[0339] Некоторые варианты осуществления относятся к способу лечения ассоциированного с антигеном-мишенью заболевания (такого как злокачественная опухоль или вирусная инфекция) у нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей эффекторные клетки (такие как Т-клетки или клетки естественные киллеры), представляющие на своей поверхности abTCR, который специфически узнает антиген-мишень, содержащий а) первую полипептидную цепь, содержащую первый антигенсвязывающий домен, содержащий домены V_H и C_H1 антитела, и первый TCRD, содержащий трансмембранный домен первой субъединицы TCR; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй антигенсвязывающий домен, содержащий домены V_L и C_L антитела, и второй TCRD, содержащий трансмембранный домен второй субъединицы TCR, где домены V_H и C_H1 первого антигенсвязывающего домена и домены V_L и C_L второго антигенсвязывающего домена формируют подобный Fab антигенсвязывающий модуль, который специфически связывает антиген-мишень, где первый TCRD и второй TCRD формируют TCRM, способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным, химерным, полусинтетическим или полностью синтетическим. В некоторых вариантах осуществления, первая субъединица TCR представляет собой цепь α TCR, и вторая субъединица TCR представляет собой TCR β цепь. В некоторых вариантах осуществления, первая субъединица TCR представляет собой TCR β цепь, и вторая субъединица TCR представляет собой цепь α TCR. В некоторых вариантах осуществления, первая субъединица TCR представляет собой цепь γ TCR, и вторая субъединица TCR представляет собой цепь δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, первая субъединица TCR представляет собой цепь δ TCR, и вторая субъединица TCR представляет собой цепь γ TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит соединительный пептид или его фрагмент из первой субъединицы TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит соединительный пептид или его фрагмент из второй субъединицы TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит часть внеклеточного домена первой субъединицы TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит часть внеклеточного домена из второй субъединицы TCR. В некоторых вариантах

осуществления, первый TCRD дополнительно содержит первый внутриклеточный домен TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит второй внутриклеточный домен TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый внутриклеточный домен TCR содержит последовательность из внутриклеточного домена первой субъединицы TCR,

5 и/или второй внутриклеточный домен TCR содержит последовательность из внутриклеточного домена второй субъединицы TCR. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит первый сигнальный пептид с аминоконца от первого антигенсвязывающего домена и/или второй сигнальный пептид с аминоконца от второго антигенсвязывающего домена. В некоторых вариантах

10 осуществления, TCRM является способным привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль, выбранный из группы, состоящей из CD3δ, CD3γ, и ζ. В некоторых вариантах осуществления, TCRM способствует формированию комплекса abTCR-CD3. В некоторых вариантах осуществления, присутствует первый пептидный линкер между первым антигенсвязывающим доменом

15 и первым TCRD и/или второй пептидный линкер между вторым антигенсвязывающим доменом и вторым TCRD. В некоторых вариантах осуществления, первая и вторая полипептидные цепи связаны, например, посредством ковалентной связи (например, пептидной или другой химической связи) или нековалентной связи. В некоторых

20 вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством а) дисульфидной связи между остатком в соединительном пептиде из первого TCRD и остатком в соединительном пептиде из второго TCRD; и/или б) дисульфидной связи между остатком в домене C_H1 антитела в первом

антигенсвязывающем домене и остатком в домене C_L антитела во втором

25 антигенсвязывающем домене. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой антиген клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности выбран из группы, состоящей из белка, углевода и липида. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной

30 поверхности представляет собой ассоциированный с заболеванием антиген, такой как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой CD19, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D или FCRL5. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень

35 представляет собой представленный на поверхности комплекс пептид/МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген), и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления,

комплекс пептид/МНС содержит пептид и белок МНС, где пептид происходит из белка, выбранного из группы, состоящей из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1 и PSA.

40 [0340] Некоторые варианты осуществления относятся к способу лечения ассоциированного с антигеном-мишенью заболевания (такого как злокачественная опухоль или вирусная инфекция) у нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей эффекторные

клетки (такие как Т-клетки или клетки естественные киллеры), представляющие на

45 своей поверхности abTCR, который специфически узнает антиген-мишень, содержащий а) первую полипептидную цепь, содержащую первый антигенсвязывающий домен, содержащий домены V_H и C_H1 антитела, и первый TCRD, содержащий трансмембранный домен из цепи α TCR; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую вторую

антигенсвязывающий домен, содержащий домены V_L и C_L антитела, и второй TCRD, содержащий трансмембранный домен из цепи β TCR, где домены V_H и C_H1 первого антигенсвязывающего домена и домены V_L и C_L второго антигенсвязывающего домена формируют подобный Fab антигенсвязывающий модуль, специфически связывающий антиген клеточной поверхности, где первый TCRD и второй TCRD формируют TCRM, способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным, химерным, полусинтетическим или полностью синтетическим. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит соединительный пептид или его фрагмент из цепи α TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит соединительный пептид или его фрагмент из цепи β TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит часть внеклеточного домена цепи α TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит часть внеклеточного домена цепи β TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит первый внутриклеточный домен TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит второй внутриклеточный домен TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый внутриклеточный домен TCR содержит последовательность из внутриклеточного домена цепи α TCR, и/или второй внутриклеточный домен TCR содержит последовательность внутриклеточного домена из цепи β TCR. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий T-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или msc). В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит первый сигнальный пептид с аминоконца от первого антигенсвязывающего домена и/или второй сигнальный пептид с аминоконца от второго антигенсвязывающего домена. В некоторых вариантах осуществления, TCRM является способным привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль, выбранный из группы, состоящей из CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\gamma\epsilon$ и $\zeta\zeta$. В некоторых вариантах осуществления, TCRM способствует формированию комплекса abTCR-CD3. В некоторых вариантах осуществления, присутствует первый пептидный линкер между первым антигенсвязывающим доменом и первым TCRD и/или второй пептидный линкер между вторым антигенсвязывающим доменом и вторым TCRD. В некоторых вариантах осуществления, первая и вторая полипептидные цепи связаны, например, посредством ковалентной связи (например, пептидной или другой химической связи) или нековалентной связи. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством а) дисульфидной связи между остатком в соединительном пептиде из первого TCRD и остатком в соединительном пептиде из второго TCRD; и/или б) дисульфидной связи между остатком в домене C_H1 антитела в первом антигенсвязывающем домене и остатком в домене C_L антитела во втором антигенсвязывающем домене. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой антиген клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности выбран из группы, состоящей из белка, углевода и липида. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой ассоциированный с заболеванием антиген, такой как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген. В некоторых вариантах

осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой CD19, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D или FCRL5. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой представленный на поверхности комплекс пептид/МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген), и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид и белок МНС, где пептид происходит из белка, выбранного из группы, состоящей из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1 и PSA. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС представляет собой белок МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-A. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A представляет собой HLA-A02. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A02 представляет собой HLA-A*02:01. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ Т-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей α и/или β TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической Т-клетки, Т-клетки-помощника, Т-клетки естественного киллера и супрессорной Т-клетки.

[0341] Некоторые варианты осуществления относятся к способу лечения ассоциированного с антигеном-мишенью заболевания (такого как злокачественная опухоль или вирусная инфекция) у нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей эффекторные клетки (такие как Т-клетки или клетки естественные киллеры), представляющие на своей поверхности abTCR, который специфически узнает антиген-мишень, содержащий а) первую полипептидную цепь, содержащую первый антигенсвязывающий домен, содержащий домены VH и CH1 антитела, и первый TCRD, содержащий трансмембранный домен из цепи β TCR; и b) вторую полипептидную цепь, содержащую второй антигенсвязывающий домен, содержащий домены VL и CL антитела и второй TCRD, содержащий трансмембранный домен из цепи α TCR, где домены VH и CH1 первого антигенсвязывающего домена и домены VL и CL второго антигенсвязывающего домена формируют подобный Fab антигенсвязывающий модуль, специфически связывающий антиген клеточной поверхности, где первый TCRD и второй TCRD формируют TCRM, способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным, химерным, полусинтетическим или полностью синтетическим. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит соединительный пептид или его фрагмент из цепи β TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит соединительный пептид или его фрагмент из цепи α TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит часть внеклеточного домена из цепи β TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит часть внеклеточного домена из цепи α TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит первый внутриклеточный домен TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит второй внутриклеточный домен TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый внутриклеточный домен TCR содержит последовательность из внутриклеточного домена цепи β TCR, и/или второй внутриклеточный домен TCR содержит последовательность из внутриклеточного домена цепи α TCR. В некоторых вариантах

осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный
 внутриклеточный домен, содержащий Т-клеточную костимулирующую передающую
 сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30
 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или myc). В некоторых вариантах
 5 осуществления, abTCR дополнительно содержит первый сигнальный пептид с амино-
 конца от первого антигенсвязывающего домена и/или второй сигнальный пептид с
 amino-конца от второго антигенсвязывающего домена. В некоторых вариантах
 осуществления, TCRM является способным привлекать по меньшей мере один
 ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль, выбранный из группы, состоящей
 10 из CD3 δ , CD3 γ и ζ . В некоторых вариантах осуществления, TCRM способствует
 формированию комплекса abTCR-CD3. В некоторых вариантах осуществления,
 присутствует первый пептидный линкер между первым антигенсвязывающим доменом
 и первым TCRD и/или второй пептидный линкер между вторым антигенсвязывающим
 доменом и вторым TCRD. В некоторых вариантах осуществления, первая и вторая
 15 полипептидные цепи связаны, например, посредством ковалентной связи (например,
 пептидной или другой химической связи) или нековалентной связи. В некоторых
 вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь
 связаны посредством а) дисульфидной связи между остатком в соединительном пептиде
 из первого TCRD и остатком в соединительном пептиде из второго TCRD; и/или б)
 20 дисульфидной связи между остатком в домене C_H1 антитела в первом
 антигенсвязывающем домене и остатком в домене C_L антитела во втором
 антигенсвязывающем домене. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень
 представляет собой антиген клеточной поверхности. В некоторых вариантах
 осуществления, антиген клеточной поверхности выбран из группы, состоящей из белка,
 25 углевода и липида. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной
 поверхности представляет собой ассоциированный с заболеванием антиген, такой как
 опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген. В некоторых вариантах
 осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой CD19, ROR1, ROR2,
 BCMA, GPRC5D или FCRL5. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень
 30 представляет собой представленный на поверхности комплекс пептид/МНС. В некоторых
 вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид, происходящий из
 ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или
 кодируемый вирусом антиген), и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления,
 комплекс пептид/МНС содержит пептид и белок МНС, где пептид происходит из белка,
 35 выбранного из группы, состоящей из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-
 LMP2A, HIV-1 и PSA. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС представляет
 собой белок МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса
 I представляет собой HLA-A. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A
 представляет собой HLA-A02. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A02
 40 представляет собой HLA-A*02:01. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная
 клетка представляет собой $\gamma\delta$ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления,
 эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ Т-клетку, модифицированную для
 блокирования или уменьшения экспрессии цепей α и/или β TCR. В некоторых вариантах
 осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической
 45 Т-клетки, Т-клетки-помощника, Т-клетки естественного киллера и супрессорной Т-
 клетки.

[0342] Некоторые варианты осуществления относятся к способу лечения
 ассоциированного с антигеном-мишенью заболевания (такого как злокачественная

опухоль или вирусная инфекция) у нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей эффекторные клетки (такие как Т-клетки или клетки естественные киллеры), представляющие на своей поверхности abTCR, который специфически узнает антиген-мишень содержащий,

5 а) первую полипептидную цепь, содержащую первый антигенсвязывающий домен, содержащий домены V_H и C_{H1} антитела, и первый TCRD, содержащий трансмембранный домен из цепи γ TCR; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй антигенсвязывающий домен, содержащий домены V_L и C_L антитела, и второй TCRD, содержащий трансмембранный домен из цепи δ TCR, где домены V_H и C_{H1} первого

10 антигенсвязывающего домена и домены V_L и C_L второго антигенсвязывающего домена формируют подобный Fab антигенсвязывающий модуль, специфически связывающий антиген клеточной поверхности, где первый TCRD и второй TCRD формируют TCRM, способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным, химерным, полусинтетическим или полностью синтетическим. В некоторых вариантах

15 осуществления, первый TCRD дополнительно содержит соединительный пептид или его фрагмент из цепи γ TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит соединительный пептид или его фрагмент из цепи δ TCR. В некоторых вариантах

20 осуществления, первый TCRD дополнительно содержит часть внеклеточного домена цепи γ TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит часть внеклеточного домена из цепи δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит первый внутриклеточный домен TCR, и/или второй TCRD дополнительно

25 содержит второй внутриклеточный домен TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый внутриклеточный домен TCR содержит последовательность из внутриклеточного домена цепи γ TCR, и/или второй внутриклеточный домен TCR содержит последовательность из внутриклеточного домена цепи δ TCR. В некоторых вариантах

30 осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или myc). В некоторых вариантах

35 осуществления, abTCR дополнительно содержит первый сигнальный пептид с аминоконца от первого антигенсвязывающего домена и/или второй сигнальный пептид с аминоконца от второго антигенсвязывающего домена. В некоторых вариантах

40 осуществления, TCRM является способным привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль выбранный из группы, состоящей из CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\gamma\epsilon$ и $\zeta\zeta$. В некоторых вариантах осуществления, TCRM способствует формированию комплекса abTCR-CD3. В некоторых вариантах осуществления, присутствует первый пептидный линкер между первым антигенсвязывающим доменом и первым TCRD и/или второй пептидный линкер между вторым антигенсвязывающим доменом и вторым TCRD. В некоторых вариантах осуществления, первая и вторая

45 полипептидные цепи связаны, например, посредством ковалентной связи (например, пептидной или другой химической связи) или нековалентной связи. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством а) дисульфидной связи между остатком в соединительном пептиде из первого TCRD и остатком в соединительном пептиде из второго TCRD; и/или б) дисульфидной связи между остатком в домене C_{H1} антитела в первом

антигенсвязывающем домене и остатком в домене C_L антитела во втором антигенсвязывающем домене. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой антиген клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности выбран из группы, состоящей из белка, углевода и липида. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой ассоциированный с заболеванием антиген, такой как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой CD19, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D или FCRL5. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой представленный на поверхности комплекс пептид/МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген), и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид и белок МНС, где пептид происходит из белка, выбранного из группы, состоящей из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1 и PSA. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС представляет собой белок МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-A. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A представляет собой HLA-A02. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A02 представляет собой HLA-A*02:01. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой αβ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой γδ Т-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей γ и/или δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической Т-клетки, Т-клетки-помощника, Т-клетки естественного киллера и супрессорной Т-клетки.

[0343] Некоторые варианты осуществления относятся к способу лечения ассоциированного с антигеном-мишенью заболевания (такого как злокачественная опухоль или вирусная инфекция) у нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей эффекторные клетки (такие как Т-клетки или клетки естественные киллеры), представляющие на своей поверхности abTCR, который специфически узнает антиген-мишень, содержащий а) первую полипептидную цепь, содержащую первый антигенсвязывающий домен, содержащий домены V_H и C_{H1} антитела, и первый TCRD, содержащий трансмембранный домен из цепи δ TCR; и b) вторую полипептидную цепь, содержащую второй антигенсвязывающий домен, содержащий домены V_L и C_L антитела, и второй TCRD, содержащий трансмембранный домен из цепи γ TCR, где домены V_H и C_{H1} первого антигенсвязывающего домена и домены V_L и C_L второго антигенсвязывающего домена формируют подобный Fab антигенсвязывающий модуль, специфически связывающий антиген клеточной поверхности, где первый TCRD и второй TCRD формируют TCRM, способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным, химерным, полусинтетическим или полностью синтетическим. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит соединительный пептид или его фрагмент из цепи δ TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит соединительный пептид или его фрагмент из цепи γ TCR. В некоторых вариантах

осуществления, первый TCRD дополнительно содержит часть внеклеточного домена цепи δ TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит часть внеклеточного домена цепи γ TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый TCRD дополнительно содержит первый внутриклеточный домен TCR, и/или второй TCRD дополнительно содержит второй внутриклеточный домен TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый внутриклеточный домен TCR содержит последовательность из внутриклеточного домена цепи δ TCR, и/или второй внутриклеточный домен TCR содержит последовательность из внутриклеточного домена цепи γ TCR. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий T-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или myc). В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит первый сигнальный пептид с аминоконца от первого антигенсвязывающего домена и/или второй сигнальный пептид с аминоконца от второго антигенсвязывающего домена. В некоторых вариантах осуществления, TCRM является способным привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль, выбранный из группы, состоящей из CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\gamma\epsilon$ и $\zeta\zeta$. В некоторых вариантах осуществления, TCRM способствует формированию комплекса abTCR-CD3. В некоторых вариантах осуществления, присутствует первый пептидный линкер между первым антигенсвязывающим доменом и первым TCRD и/или второй пептидный линкер между вторым антигенсвязывающим доменом и вторым TCRD. В некоторых вариантах осуществления, первая и вторая полипептидные цепи связаны, например, посредством ковалентной связи (например, пептидной или другой химической связи) или нековалентной связи. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством а) дисульфидной связи между остатком в соединительном пептиде из первого TCRD и остатком в соединительном пептиде из второго TCRD; и/или б) дисульфидной связи между остатком в домене C_H1 антитела в первом антигенсвязывающем домене и остатком в домене C_L антитела во втором антигенсвязывающем домене. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой антиген клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности выбран из группы, состоящей из белка, углевода и липида. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой ассоциированный с заболеванием антиген, такой как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой CD19, ROR1, ROR2, VCMA, GPRC5D или FCRL5. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой представленный на поверхности комплекс пептид/МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген), и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид и белок МНС, где пептид происходит из белка, выбранного из группы, состоящей из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1 и PSA. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС представляет собой белок МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-A. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A представляет собой HLA-A02. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A02 представляет собой HLA-A*02:01. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная

клетка представляет собой $\alpha\beta$ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ Т-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей γ и/или δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической Т-клетки, Т-клетки-помощника, Т-клетки естественного киллера и супрессорной Т-клетки.

[0344] Некоторые варианты осуществления относятся к способу лечения ассоциированного с антигеном-мишенью заболевания (такого как злокачественная опухоль или вирусная инфекция) у нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей эффекторные клетки (такие как Т-клетки или клетки естественные киллеры), представляющие на своей поверхности abTCR, который специфически узнает антиген-мишень, содержащий а) первую полипептидную цепь, содержащую, в порядке от amino-конца до карбокси-конца, первый антигенсвязывающий домен и первый TCRD содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 15; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую, в порядке от amino-конца до карбокси-конца, второй антигенсвязывающий домен и второй TCRD, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 16; где первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен формируют подобный Fab антигенсвязывающий модуль, который специфически связывает антиген-мишень, где первый TCRD и второй TCRD формируют TCRM, способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным, химерным, полусинтетическим или полностью синтетическим. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий а) по меньшей мере одну Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность, содержащую (например, состоящую из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 70 или 71; и/или б) эпитоп-метку, содержащую (например, состоящую из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого антигенсвязывающего домена и/или второй сигнальный пептид с amino-конца от второго антигенсвязывающего домена, где первый и/или второй сигнальный пептиды содержат аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, TCRM является способным привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль выбранный из группы, состоящей из CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\zeta\eta$ и $\zeta\zeta$. В некоторых вариантах осуществления, TCRM способствует формированию комплекса abTCR-CD3. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством а) дисульфидной связи между остатком в соединительном пептиде из первого TCRD и остатком в соединительном пептиде из второго TCRD; и/или б) дисульфидной связи между остатками в доменах CH1 и CL антитела в подобном Fab антигенсвязывающем модуле. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой антиген клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности выбран из группы, состоящей из белка, углевода и липида. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой ассоциированный с заболеванием антиген, такой как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген. В некоторых вариантах

осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой CD19, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D или FCRL5. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой представленный на поверхности комплекс пептид/МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген), и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид и белок МНС, где пептид происходит из белка, выбранного из группы, состоящей из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1 и PSA. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС представляет собой белок МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-A. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A представляет собой HLA-A02. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A02 представляет собой HLA-A*02:01. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ Т-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей α и/или β TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической Т-клетки, Т-клетки-помощника, Т-клетки естественного киллера и супрессорной Т-клетки.

[0345] Некоторые варианты осуществления относятся к способу лечения ассоциированного с антигеном-мишенью заболевания (такого как злокачественная опухоль или вирусная инфекция) у нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей эффекторные клетки (такие как Т-клетки или клетки естественные киллеры), представляющие на своей поверхности abTCR, который специфически узнает антиген-мишень, содержащий а) первую полипептидную цепь, содержащую, в порядке от amino-конца до карбокси-конца, первый антигенсвязывающий домен и первый TCRD, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 17; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую, в порядке от amino-конца до карбокси-конца, второй антигенсвязывающий домен и второй TCRD, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 18; где первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен формируют подобный Fab антигенсвязывающий модуль, который специфически связывает антиген-мишень, где первый TCRD и второй TCRD формируют TCRM, способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным, химерным, полусинтетическим или полностью синтетическим. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий а) по меньшей мере один Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность, содержащую (например, состоящую из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 70 или 71; и/или б) эпитоп-метку, содержащую (например, состоящую из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого антигенсвязывающего домена и/или второй сигнальный пептид с amino-конца от второго антигенсвязывающего домена, где первый и/или второй сигнальный пептиды содержат аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, TCRM является способным привлекать по

меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль выбранный из группы, состоящей из CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\zeta\eta$ и $\zeta\zeta$. В некоторых вариантах осуществления, TCRM способствует формированию комплекса $\alpha\beta$ TCR-CD3. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны

5 посредством а) дисульфидной связи между остатком в соединительном пептиде из первого TCRD и остатком в соединительном пептиде из второго TCRD; и/или б) дисульфидной связи между остатками в доменах C_H1 и C_L антитела в подобном Fab антигенсвязывающем модуле. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень

10 представляет собой антиген клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности выбран из группы, состоящей из белка, углевода и липида. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой ассоциированный с заболеванием антиген, такой как

15 опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой CD19, ROR1, ROR2, VCMA, GPRC5D или FCRL5. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой представленный на поверхности комплекс пептид/МНС. В некоторых

20 вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген), и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид и белок МНС, где пептид происходит из белка,

25 выбранного из группы, состоящей из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1 и PSA. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС представляет собой белок МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-A. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A

30 представляет собой HLA-A02. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A02 представляет собой HLA-A*02:01. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ Т-клетку, модифицированную для

блокирования или уменьшения экспрессии цепей TCR α и/или β . В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической Т-клетки, Т-клетки-помощника, Т-клетки естественного киллера и супрессорной Т-клетки.

[0346] Некоторые варианты осуществления относятся к способу лечения ассоциированного с антигеном-мишенью заболевания (такого как злокачественная

35 опухоль или вирусная инфекция) у нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей эффекторные клетки (такие как Т-клетки или клетки естественные киллеры), представляющие на

40 своей поверхности $\alpha\beta$ TCR, который специфически узнает антиген-мишень, содержащий а) первую полипептидную цепь, содержащую, в порядке от amino-конца до карбокси-конца, первый антигенсвязывающий домен и первый TCRD, содержащий

45 аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 19; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую, в порядке от amino-конца до карбокси-конца, второй антигенсвязывающий домен и второй TCRD, содержащий аминокислотную

последовательность из SEQ ID NO: 20; где первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен формируют подобный Fab антигенсвязывающий модуль, который специфически связывает антиген-мишень, где первый TCRD и второй TCRD формируют TCRM, способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль. В некоторых вариантах осуществления, подобный

Fab антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным, химерным, полусинтетическим или полностью синтетическим. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий а) по меньшей мере одну Т-клеточную

5 костимулирующую передающую сигналы последовательность, содержащую (например, состоящую из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 70 или 71; и/или б) эпитоп-метку, содержащую (например, состоящую из) аминокислотную

10 последовательность из любой из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит первый сигнальный пептид с аминоконца от первого антигенсвязывающего домена и/или второй сигнальный пептид с

аминоконца от второго антигенсвязывающего домена, где первый и/или второй сигнальный пептиды содержат аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, TCRM является способным привлекать по

15 меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль выбранный из группы, состоящей из CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\zeta\epsilon$ и $\zeta\zeta$. В некоторых вариантах осуществления, TCRM способствует формированию комплекса abTCR-CD3. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны

20 посредством а) дисульфидной связи между остатком в соединительном пептиде из первого TCRD и остатком в соединительном пептиде из второго TCRD; и/или б) дисульфидной связи между остатками в доменах C_H1 и C_L антитела в подобном Fab

антигенсвязывающем модуле. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой антиген клеточной поверхности. В некоторых вариантах

25 осуществления, антиген клеточной поверхности выбран из группы, состоящей из белка, углевода и липида. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой ассоциированный с заболеванием антиген, такой как

опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой CD19, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D или FCRL5. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень

30 представляет собой представленный на поверхности комплекс пептид/МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или

35 кодируемый вирусом антиген), и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид и белок МНС, где пептид происходит из белка, выбранного из группы, состоящей из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1 и PSA. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС представляет собой белок МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-A. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A

40 представляет собой HLA-A02. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A02 представляет собой HLA-A*02:01. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ Т-клетку, модифицированную для

блокирования или уменьшения экспрессии цепей γ и/или δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической Т-клетки, Т-клетки-помощника, Т-клетки естественного киллера и супрессорной Т-

45 клетки.

[0347] Некоторые варианты осуществления относятся к способу лечения ассоциированного с антигеном-мишенью заболевания (такого как злокачественная опухоль или вирусная инфекция) у нуждающегося в этом индивидуума, включающему

введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей эффекторные клетки (такие как Т-клетки или клетки естественные киллеры), представляющие на своей поверхности abTCR, который специфически узнает антиген-мишень, содержащий

а) первую полипептидную цепь, содержащую, в порядке от amino-конца до карбокси-конца, первый антигенсвязывающий домен и первый TCRD, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 21; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую, в порядке от amino-конца до карбокси-конца, второй антигенсвязывающий домен и второй TCRD, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 22; где первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен формируют подобный Fab антигенсвязывающий модуль, который специфически связывает антиген-мишень, где первый TCRD и второй TCRD формируют TCRM, способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль. В некоторых вариантах осуществления, подобный Fab антигенсвязывающий модуль является человеческим, гуманизированным, химерным, полусинтетическим или полностью синтетическим. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий а) по меньшей мере один Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность, содержащую (например, состоящую из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 70 или 71; и/или б) эпитоп-метку, содержащую (например, состоящую из) аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого антигенсвязывающего домена и/или второй сигнальный пептид с amino-конца от второго антигенсвязывающего домена, где первый и/или второй сигнальный пептиды содержат аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, TCRM является способным привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль выбранный из группы, состоящей из CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\gamma\epsilon$ и $\zeta\chi$. В некоторых вариантах осуществления, TCRM способствует формированию комплекса abTCR-CD3. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством а) дисульфидной связи между остатком в соединительном пептиде из первого TCRD и остатком в соединительном пептиде из второго TCRD; и/или б) дисульфидной связи между остатками в доменах C_H1 и C_L антитела в подобном Fab антигенсвязывающем модуле. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой антиген клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности выбран из группы, состоящей из белка, углевода и липида. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой ассоциированный с заболеванием антиген, такой как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген клеточной поверхности представляет собой CD19, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D или FCRL5. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой представленный на поверхности комплекс пептид/МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС содержит пептид, происходящий из ассоциированного с заболеванием антигена (такого как опухолеассоциированный или кодируемый вирусом антиген), и белок МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс пептид/МНС пептид и белок МНС, где пептид происходит из белка, выбранного из группы, состоящей из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1 и PSA. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС представляет собой белок

МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления, белок МНС класса I представляет собой HLA-A. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A представляет собой HLA-A02. В некоторых вариантах осуществления, HLA-A02 представляет собой HLA-A*02:01. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ T-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ T-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей γ и/или δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической T-клетки, T-клетки-помощника, T-клетки естественного киллера и супрессорной T-клетки.

10 [0348] Некоторые варианты осуществления относятся к способу лечения ассоциированного с AFP заболевания у нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей эффекторные клетки (такие как T-клетки или клетки естественные киллеры), представляющие на своей поверхности abTCR, содержащий а) первую полипептидную

15 цепь, содержащую первый домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 23; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 24, где первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством одной или нескольких дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления,

20 abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий T-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или myc). В некоторых вариантах осуществления, эпитоп-метка содержит любую из аминокислотных последовательностей

25 из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого домена abTCR, и/или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с amino-конца от второго домена abTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды содержат (например, состоят

30 из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ T-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ T-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей α и/или β TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы,

35 состоящей из цитотоксической T-клетки, T-клетки-помощника, T-клетки естественного киллера и супрессорной T-клетки.

[0349] Некоторые варианты осуществления относятся к способу лечения ассоциированного с AFP заболевания у нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей

40 эффекторные клетки (такие как T-клетки или клетки естественные киллеры), представляющие на своей поверхности abTCR, содержащий а) первую полипептидную цепь, содержащую первый домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 25; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:

45 26, где первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством одной или нескольких дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий T-клеточную костимулирующую передающую

сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или мус). В некоторых вариантах осуществления, эпитоп-метка содержит любую из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с амино-конца от первого домена abTCR, и/или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с амино-конца от второго домена abTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ T-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ T-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей α и/или β TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической T-клетки, T-клетки-помощника, T-клетки естественного киллера и супрессорной T-клетки.

[0350] Некоторые варианты осуществления относятся к способу лечения ассоциированного с AFP заболевания у нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей эффекторные клетки (такие как T-клетки или клетки естественные киллеры), представляющие на своей поверхности abTCR, содержащий а) первую полипептидную цепь, содержащую первый домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 27; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 28, где первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством одной или нескольких дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий T-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или мус). В некоторых вариантах осуществления, эпитоп-метка содержит любую из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с амино-конца от первого домена abTCR, и/или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с амино-конца от второго домена abTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ T-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ T-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей α и/или β TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической T-клетки, T-клетки-помощника, T-клетки естественного киллера и супрессорной T-клетки.

[0351] Некоторые варианты осуществления относятся к способу лечения ассоциированного с AFP заболевания у нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей эффекторные клетки (такие как T-клетки или клетки естественные киллеры), представляющие на своей поверхности abTCR содержащий а) первую полипептидную цепь, содержащую первый домен abTCR, содержащий аминокислотную

последовательность из SEQ ID NO: 29; и b) вторую полипептидную цепь, содержащую второй домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 30, где первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством одной или нескольких дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG, или msc). В некоторых вариантах осуществления, эпитоп-метка содержит любую из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого домена abTCR, и/или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с amino-конца от второго домена abTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ Т-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей γ и/или δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической Т-клетки, Т-клетки-помощника, Т-клетки естественного киллера и супрессорной Т-клетки.

[0352] Некоторые варианты осуществления относятся к способу лечения ассоциированного с AFP заболевания у нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей эффекторные клетки (такие как Т-клетки или клетки естественные киллеры), представляющие на своей поверхности abTCR, содержащий а) первую полипептидную цепь, содержащую первый домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 31; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 32, где первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством одной или нескольких дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или msc). В некоторых вариантах осуществления, эпитоп-метка содержит любую из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого домена abTCR, и/или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с amino-конца от второго домена abTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ Т-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей γ и/или δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической Т-клетки, Т-клетки-помощника, Т-клетки естественного киллера и супрессорной Т-клетки.

[0353] Некоторые варианты осуществления относятся к способу лечения ассоциированного с AFP заболевания у нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей эффекторные клетки (такие как Т-клетки или клетки естественные киллеры), представляющие на своей поверхности abTCR, содержащий а) первую полипептидную цепь, содержащую первый домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 33; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 34, где первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством одной или нескольких дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или мус). В некоторых вариантах осуществления, эпитоп-метка содержит любую из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого домена abTCR и/или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с amino-конца от второго домена abTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ Т-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей γ и/или δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической Т-клетки, Т-клетки-помощника, Т-клетки естественного киллера и супрессорной Т-клетки.

[0354] Некоторые варианты осуществления относятся к способу лечения ассоциированного с AFP заболевания у нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей эффекторные клетки (такие как Т-клетки или клетки естественные киллеры), представляющие на своей поверхности abTCR, содержащий а) первую полипептидную цепь, содержащую первый домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 35; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 36, где первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством одной или нескольких дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или мус). В некоторых вариантах осуществления, эпитоп-метка содержит любую из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого домена abTCR, и/или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с amino-конца от второго домена abTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах

осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ Т-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей γ и/или δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической Т-клетки, Т-клетки-помощника, Т-клетки естественного киллера и супрессорной Т-клетки.

[0355] Некоторые варианты осуществления относятся к способу лечения ассоциированного с CD19 заболевания у нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей эффекторные клетки (такие как Т-клетки или клетки естественные киллеры), представляющие на своей поверхности abTCR, содержащий а) первую полипептидную цепь, содержащую первый домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 42; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 43, где первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством одной или нескольких дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или msc). В некоторых вариантах осуществления, эпитоп-метка содержит любую из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого домена abTCR, и/или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с amino-конца от второго домена abTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ Т-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей γ и/или δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической Т-клетки, Т-клетки-помощника, Т-клетки естественного киллера и супрессорной Т-клетки.

[0356] Некоторые варианты осуществления относятся к способу лечения ассоциированного с CD19 заболевания у нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей эффекторные клетки (такие как Т-клетки или клетки естественные киллеры), представляющие на своей поверхности abTCR, содержащий а) первую полипептидную цепь, содержащую первый домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 42; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 54, где первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством одной или нескольких дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или msc). В некоторых вариантах осуществления, эпитоп-метка содержит любую из аминокислотных последовательностей

из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого домена abTCR, и/или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с amino-конца от второго домена abTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ T-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ T-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей γ и/или δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической T-клетки, T-клетки-помощника, T-клетки естественного киллера и супрессорной T-клетки.

[0357] Некоторые варианты осуществления относятся к способу лечения ассоциированного с CD19 заболевания у нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей эффекторные клетки (такие как T-клетки или клетки естественные киллеры), представляющие на своей поверхности abTCR, содержащий а) первую полипептидную цепь, содержащую первый домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 55; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 54, где первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством одной или нескольких дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий T-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30 или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или msc). В некоторых вариантах осуществления, эпитоп-метка содержит любую из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого домена abTCR, и/или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с amino-конца от второго домена abTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ T-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ T-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей γ и/или δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической T-клетки, T-клетки-помощника, T-клетки естественного киллера и супрессорной T-клетки.

[0358] Некоторые варианты осуществления относятся к способу лечения ассоциированного с CD19 заболевания у нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей эффекторные клетки (такие как T-клетки или клетки естественные киллеры), представляющие на своей поверхности abTCR, содержащий а) первую полипептидную цепь, содержащую первый домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 56; и б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй домен abTCR, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 54, где первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны посредством

одной или нескольких дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления, abTCR дополнительно содержит по меньшей мере один вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий Т-клеточную костимулирующую передающую сигналы последовательность (например, из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, или CD40) и/или эпитоп-метку (такую как HA, FLAG или тус). В некоторых вариантах осуществления, эпитоп-метка содержит любую из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 50-52. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с amino-конца от первого домена abTCR, и/или вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с amino-конца от второго домена abTCR. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй сигнальный пептиды содержат (например, состоят из) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ Т-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии цепей γ и/или δ TCR. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической Т-клетки, Т-клетки-помощника, Т-клетки естественного киллера и супрессорной Т-клетки.

[0359] Предусмотрены также способы лечения ассоциированного с антигеном-мишенью заболевания у нуждающегося в этом индивидуума, включающие введение индивидууму композиции, содержащей множество эффекторных клеток, экспрессирующих различные abTCR. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, в соответствии с любым из способов лечения ассоциированного с антигеном-мишенью заболевания у индивидуума, описанного в настоящем описании, композиция представляет собой гетерогенную композицию эффекторных клеток с abTCR, как описано в настоящем описании.

[0360] Например, некоторые варианты осуществления относятся к способу лечения ассоциированного с антигеном-мишенью заболевания (такого как злокачественная опухоль или вирусная инфекция) у нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества гетерогенной композиции эффекторных клеток с abTCR, содержащей множество популяций эффекторных клеток с abTCR в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, где все из эффекторных клеток с abTCR в композиции относятся к одному и тому же типу клеток (например, все эффекторные клетки с abTCR представляют собой цитотоксические Т-клетки), где каждая популяция эффекторных клеток с abTCR экспрессирует отличный от других abTCR, и где по меньшей мере одна популяция эффекторных клеток с abTCR экспрессирует abTCR, специфически связывающий антиген-мишень. В некоторых вариантах осуществления, эффекторные клетки с abTCR представляют собой Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, эффекторные клетки с abTCR выбраны из группы, состоящей из цитотоксических Т-клеток, Т-клеток-помощников, Т-клеток - естественных киллеров и супрессорных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, каждая популяция эффекторных клеток с abTCR экспрессирует abTCR, специфически связывающий антиген-мишень. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна популяция эффекторных клеток с abTCR экспрессирует abTCR, специфически связывающий отличный антиген-мишень. В некоторых вариантах осуществления, где по меньшей мере одна популяция эффекторных клеток с abTCR экспрессирует abTCR, специфически связывающий отличный антиген-мишень, каждый из различных антигенов-мишеней ассоциирован с заболеванием,

ассоциированным с антигеном-мишенью.

[0361] Некоторые варианты осуществления относятся к способу лечения ассоциированного с антигеном-мишенью заболевания (такого как злокачественная опухоль или вирусная инфекция) у нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества гетерогенной композиции эффекторных клеток с abTCR, содержащей множество популяций эффекторных клеток с abTCR в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, где по меньшей мере одна популяция эффекторных клеток с abTCR относится к отличному от других типу клеток, и где по меньшей мере одна популяция эффекторных клеток с abTCR экспрессирует abTCR, специфически связывающий антиген-мишень. В некоторых вариантах осуществления, все из популяций эффекторных клеток с abTCR относятся к различным типам клеток. В некоторых вариантах осуществления, эффекторные клетки с abTCR представляют собой Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, каждая популяция эффекторных клеток с abTCR состоит из типа клеток, выбранных из группы, состоящей из цитотоксических Т-клеток, Т-клеток-помощников, Т-клеток - естественных киллеров и супрессорных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, каждая популяция эффекторных клеток с abTCR экспрессирует один и тот же abTCR. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна популяция эффекторных клеток с abTCR экспрессирует отличный от других abTCR. В некоторых вариантах осуществления, каждая популяция эффекторных клеток с abTCR экспрессирует abTCR, специфически связывающий антиген-мишень. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна популяция эффекторных клеток с abTCR экспрессирует abTCR, специфически связывающий отличный антиген-мишень. В некоторых вариантах осуществления, где по меньшей мере одна популяция эффекторных клеток с abTCR экспрессирует abTCR, специфически связывающий отличный антиген-мишень, каждый из различных антигенов-мишеней ассоциирован с заболеванием, ассоциированным с антигеном-мишенью.

[0362] Некоторые варианты осуществления относятся к способу лечения заболевания, ассоциированного с множеством антигенов-мишеней у нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества гетерогенной композиции эффекторных клеток с abTCR, содержащей множество популяций эффекторных клеток с abTCR в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, где все из эффекторных клеток с abTCR в композиции относятся к одному и тому же типу клеток (например, все эффекторные клетки с abTCR представляют собой цитотоксические Т-клетки), где каждая популяция эффекторных клеток с abTCR экспрессирует отличный от других abTCR, и где для каждого антигена-мишени из множества антигенов-мишеней, по меньшей мере одна популяция эффекторных клеток с abTCR экспрессирует abTCR, специфически связывающий антиген-мишень. В некоторых вариантах осуществления, эффекторные клетки с abTCR представляют собой Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, эффекторные клетки с abTCR выбраны из группы, состоящей из цитотоксических Т-клеток, Т-клеток-помощников, Т-клеток - естественных киллеров и супрессорных Т-клеток.

[0363] Некоторые варианты осуществления относятся к способу лечения заболевания, ассоциированного с множеством антигенов-мишеней, у нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества гетерогенной композиции эффекторных клеток с abTCR, содержащей множество

популяций эффекторных клеток с абТСР в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, где по меньшей мере одна популяция эффекторных клеток с абТСР относится к отличному от других типу клеток, и где для каждого антигена-мишени из множества антигенов-мишеней, по меньшей мере одна популяция эффекторных клеток с абТСР экспрессирует абТСР, специфически связывающий антиген-мишень. В некоторых вариантах осуществления, все из популяций эффекторных клеток с абТСР относятся к различным типам клеток. В некоторых вариантах осуществления, эффекторные клетки с абТСР представляют собой Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, каждая популяция эффекторных клеток с абТСР состоит из типа клеток, выбранных из группы, состоящей из цитотоксических Т-клеток, Т-клеток-помощников, Т-клеток - естественных киллеров и супрессорных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, каждая популяция эффекторных клеток с абТСР экспрессирует отличный от других абТСР.

[0364] В некоторых вариантах осуществления, индивидуум представляет собой млекопитающего (например, человека, не относящегося к человеку примата, крысу, мышь, корову, лошадь, свинью, овцу, козу, собаку, кошку и т.д.). В некоторых вариантах осуществления, индивидуум представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления, индивидуум представляет собой клинического пациента, добровольца в клинических исследованиях, экспериментальное животное и т.д. В некоторых вариантах осуществления, индивидуум имеет возраст младше приблизительно 60 лет (включая, например, возраст младше, чем приблизительно любой из 50, 40, 30, 25, 20, 15 или 10 лет). В некоторых вариантах осуществления, индивидуум имеет возраст старше приблизительно 60 лет (включая, например, возраст старше, чем приблизительно любой из 70, 80, 90 или 100 лет). В некоторых вариантах осуществления, индивидуум имеет диагноз или предрасположенность из-за факторов окружающей среды или генетических факторов для одного или нескольких из заболеваний или нарушений, описанных в настоящем описании (таких как злокачественная опухоль или вирусная инфекция). В некоторых вариантах осуществления, индивидуум имеет один или несколько факторов риска, ассоциированных с одним или несколькими заболеваниями или нарушениями, описанными в настоящем описании.

[0365] В некоторых вариантах осуществления, композиции эффекторных клеток с абТСР по изобретению вводят в комбинации с вторым, третьим или четвертым средством (включая, например, антинеопластическое средство, ингибирующее рост средство, цитотоксическое средство или химиотерапевтическое средство) для лечения заболеваний или нарушений, в которые вовлечена экспрессия антигена-мишени. В некоторых вариантах осуществления, композицию эффекторной клетки с абТСР вводят в комбинации с цитокином (таким как IL-2). В некоторых вариантах осуществления, абТСР вводят в комбинации со средством, которое увеличивает экспрессию белков МНС и/или улучшает представление пептидов на поверхности посредством белков МНС. В некоторых вариантах осуществления, средство включает, например, агонисты рецептора IFN, ингибиторы Hsp90, усилители экспрессии p53 и химиотерапевтические средства. В некоторых вариантах осуществления, средство представляет собой агонист рецептора IFN, включая, например, IFN γ , IFN β и IFN α . В некоторых вариантах осуществления, средство представляет собой ингибитор Hsp90, включая, например, танеспимицин (17-AAG), алвеспимицин (17-DMAG), ретаспимицин (PI-504), PI-493, CNF2024/ВІВ021, MPC-3100, Debio 0932 (CUDC-305), PU-H71, ганетеспиб (STA-9090), NVP-AUY922 (VER-52269), HSP990, KW-2478, AT13387, SNX-5422, DS-2248, и XL888. В некоторых вариантах осуществления, средство представляет собой усилитель экспрессии

p53, включая, например, 5-фторурацил и нутлин-3. В некоторых вариантах осуществления, средство представляет собой химиотерапевтическое средство, включая, например, топотекан, этопозид, цисплатин, паклитаксел и винбластин.

[0366] Некоторые варианты осуществления относятся к способу лечения положительного по антигену-мишени заболевания у нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму композиции эффекторных клеток с abTCR в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, в комбинации с цитокином (таким как IL-2). В некоторых вариантах осуществления, композиция эффекторной клетки с abTCR и цитокин вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления, композицию эффекторных клеток с abTCR и цитокин вводят последовательно.

[0367] Некоторые варианты осуществления относятся к способу лечения положительного по антигену-мишени заболевания у нуждающегося в этом индивидуума, где клетки, экспрессирующие антиген-мишень, в норме не представляют или представляют на относительно низком уровне на своей поверхности комплекс, содержащий антиген-мишень и белок МНС класса I, где способ, включает введение индивидууму композиций эффекторных клеток с abTCR в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, в комбинации со средством, которое увеличивает экспрессию белков МНС класса I и/или улучшает представление антигенов-мишеней на поверхности посредством белков МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления, средство включает, например, агонисты рецептора IFN, ингибиторы Hsp90, усилители экспрессии p53 и химиотерапевтические средства. В некоторых вариантах осуществления, средство представляет собой агонист рецептора IFN, включая, например, IFN γ , IFN β и IFN α . В некоторых вариантах осуществления, средство представляет собой ингибитор Hsp90, включая, например, танеспимицин (17-AAG), алвеспимицин (17-DMAG), ретаспимицин (PI-504), PI-493, CNF2024/ВПВ021, MPC-3100, Debio 0932 (CUDC-305), PU-H71, ганетеспиб (STA-9090), NVP-AUY922 (VER-52269), HSP990, KW-2478, AT13387, SNX-5422, DS-2248 и XL888. В некоторых вариантах осуществления, средство представляет собой усилитель экспрессии p53, включая, например, 5-фторурацил и нутлин-3. В некоторых вариантах осуществления, средство представляет собой химиотерапевтическое средство, включая, например, топотекан, этопозид, цисплатин, паклитаксел и винбластин. В некоторых вариантах осуществления, композицию эффекторной клетки с abTCR и средство вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления, композицию эффекторной клетки с abTCR и средство вводят последовательно.

[0368] Некоторые варианты осуществления относятся к способу лечения ассоциированного с антигеном-мишенью заболевания (такого как злокачественная опухоль или вирусная инфекция) у нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую abTCR, в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем описании. Способы доставки генов известны в данной области. См., например, Патенты США No. 5399346, 5580859, 5589466, полное содержание которых приведено в настоящем описании посредством ссылки.

[0369] Лечение злокачественных опухолей можно оценивать, например, по регрессии опухоли, уменьшению массы или размера опухоли, времени до прогрессирования, длительности выживаемости, выживаемости без прогрессирования, общей частоте ответа, длительности ответа, качеству жизни, экспрессии и/или активности белка. Можно использовать способы определения эффективности терапии, включая, например,

измерение ответа посредством радиологической визуализации.

[0370] В некоторых вариантах осуществления, эффективность лечения измеряют как процент ингибирования роста опухоли (% TGI), рассчитанный с использованием уравнения $100 - (T/C \times 100)$, где T представляет собой средний относительный объем опухоли для опухоли после лечения, и C представляет собой средний относительный объем опухоли для опухоли без лечения. В некоторых вариантах осуществления, %TGI составляет приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95% или более 95%.

[0371] Лечение вирусной инфекции можно оценивать, например, по вирусной нагрузке, длительности выживаемости, качеству жизни, экспрессии и/или активности белка.

Заболевания

[0372] Эффекторные клетки с abTCR в некоторых вариантах осуществления можно использовать для лечения злокачественных опухолей, ассоциированных с антигеном-мишенью. Злокачественные опухоли, которые можно лечить с использованием любого из способов, описанных в настоящем описании, включают опухоли, которые не являются васкуляризированными, или еще не являются значительно васкуляризированными, так же как васкуляризированные опухоли. Злокачественные опухоли могут включать не солидные опухоли (такие как гематологические опухоли, например, лейкозы и лимфомы) или могут включать солидные опухоли. Типы злокачественных опухолей, подлежащих лечению с использованием эффекторных клеток с abTCR по изобретению, включают, но без ограничения, карциному, бластому и саркому, и конкретные лейкозы или злокачественные новообразования лимфоидной ткани, доброкачественные и злокачественные опухоли, и злокачественные новообразования, например, саркомы, карциномы и меланомы. Включены также опухоли/злокачественные опухоли взрослых и опухоли/злокачественные опухоли детей.

[0373] Гематологические злокачественные опухоли представляют собой злокачественные опухоли крови или костного мозга. Примеры гематологических (или гематогенных) злокачественных опухолей включают лейкозы, включая острые лейкозы (такие как острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, острый миелогенный лейкоз и миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный лейкоз и эритролейкоз), хронический лейкоз (такой как хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз, хронический миелогенный лейкоз и хронический лимфоцитарный лейкоз), истинную полицитемию, лимфому, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому (вялотекущие формы и формы с высокой степенью злокачественности), множественную миелому, плазмацитому, макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей, миелодиспластический синдром, волосатоклеточный лейкоз и миелодисплазию.

[0374] Солидные опухоли представляют собой аномальные массы ткани, которые обычно не содержат цист или жидких областей. Солидные опухоли могут являться доброкачественными или злокачественными. Различные типы солидных опухолей названы по типу клеток, которые их формируют (такие как саркомы, карциномы и лимфомы). Примеры солидных опухолей, таких как саркомы и карциномы, включают адренокортикальную карциному, холангиокарциному, фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеосаркому и другие саркомы, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, карциному ободочной кишки, рак желудка, злокачественные новообразования лимфоидной ткани, рак поджелудочной

железы, рак молочной железы, рак легкого, рак яичника, рак предстательной железы, печеночно-клеточную карциному, плоскоклеточную карциному, базально-клеточную карциному, аденокарциному, карциному потовых желез, рак щитовидной железы (например, медуллярную карциному щитовидной железы и папиллярную карциному щитовидной железы), феохромоцитомы, карциному сальной железы, папиллярную карциному, папиллярные аденокарциномы, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, почечноклеточный рак, гепатому, карциномы желчных протоков, хориокарциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки (например, карциному шейки матки и преинвазивную цервикальную дисплазию), колоректальный рак, злокачественную опухоль ануса, анального канала, или анального канала и прямой кишки, рак влагалища, рак наружных женских половых органов (например, плоскоклеточную карциному, интраэпителиальную карциному, аденокарциному и фибросаркому), рак полового члена, рак ротоглотки, рак пищевода, злокачественные опухоли головы (например, плоскоклеточную карциному), злокачественные опухоли шеи (например, плоскоклеточную карциному), рак яичка (например, семиному, тератому, эмбриональную карциному, тератокарциному, хориокарциному, саркому, опухоль из клеток Лейдига, фиброму, фиброаденому, аденоматоидные опухоли и липому), карциному мочевого пузыря, рак почки, меланому, злокачественную опухоль матки (например, эндометриальную карциному), уротелиальные злокачественные опухоли (например, плоскоклеточную карциному, переходно-клеточную карциному, аденокарциному, злокачественную опухоль мочеточника, и рак мочевого пузыря) и опухоли ЦНС (такие как глиома (такая как глиома ствола головного мозга и смешанные глиомы), глиобластома (также известная как мультиформная глиобластома), астроцитомы, лимфома ЦНС, герминома, медуллобластома, шваннома, краниофарингиома, эпендимомы, пинеалома, гемангиобластома, невринома слухового нерва, олигодендроглиома, менингиома, нейробластома, ретинобластома и метастазы в головном мозге).

[0375] Лечение злокачественных опухолей можно оценивать, например, по регрессии опухоли, уменьшению массы или размера опухоли, времени до прогрессирования, длительности выживаемости, выживаемости без прогрессирования, общей частоте ответа, длительности ответа, качеству жизни, экспрессии и/или активности белка. Можно использовать способы определения эффективности терапии, включая, например, измерение ответа посредством радиологической визуализации.

[0376] Эффекторные клетки с αbTCR в других вариантах осуществления можно использовать для лечения инфекционных заболеваний посредством нацеливания на ассоциированные с патогеном (такие как кодируемые вирусом) антигены. Инфекция, подлежащая предотвращению или лечению, например, может быть вызвана вирусом, бактерией, простейшим или паразитом. Антиген-мишень может представлять собой патогенный белок, полипептид или пептид, который является ответственным за заболевание, вызванное патогеном, или является способным индуцировать иммунологический ответ у хозяина, инфицированного патогеном. Патогенные антигены, на которые можно нацеливать эффекторные клетки с αbTCR , включают, но без ограничения, антигены, происходящие из *Acinetobacter baumannii*, рода *Anaplasma*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ancylostoma braziliense*, *Ancylostoma duodenale*, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Ascaris lumbricoides*, рода *Aspergillus*, *Astroviridae*, рода *Babesia*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bartonella henselae*, вируса ВК, *Blastocystis hominis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, рода *Borrelia*, видов *Borrelia*, рода *Brucella*, *Brugia malayi*, семейства *Bunyaviridae*, *Burkholderia cepacia* и других видов

Burkholderia, Burkholderia mallei, Burkholderia pseudomallei, семейства Caliciviridae, рода
 Campylobacter, Candida albicans, видов Candida, Chlamydia trachomatis, Chlamydophila
 pneumoniae, Chlamydophila psittaci, приона CJD, Clonorchis sinensis, Clostridium botulinum,
 Clostridium difficile, Clostridium perfringens, Clostridium perfringens, видов Clostridium,
 5 Clostridium tetani, видов Coccidioides, коронавируса, Corynebacterium diphtheriae, Coxiella
 burnetii, вируса конго-крымской геморрагической лихорадки, Cryptococcus neoformans,
 рода Cryptosporidium, цитомегаловируса (CMV), вирусов Денге (DEN-1, DEN-2, DEN-3
 и DEN-4), Dientamoeba fragilis, вируса Эбола (EBOV), рода Echinococcus, Ehrlichia
 chaffeensis, Ehrlichia ewingii, рода Ehrlichia, Entamoeba histolytica, рода Enterococcus, рода
 10 Enterovirus, энтеровирусов, в основном вирус Коксаки А и энтеровируса 71 (EV71),
 видов Epidermophyton, вируса Эпштейна-Барр (EBV), Escherichia coli O157:H7, O111 и
 O104:H4, Fasciola hepatica и Fasciola gigantica, приона FFI, суперсемейства Filarioidea,
 флавивирусов, Francisella tularensis, рода Fusobacterium, Geotrichum candidum, Giardia
 intestinalis, видов Gnathostoma, приона GSS, вируса Гуанарито, Haemophilus ducreyi,
 15 Haemophilus influenzae, Helicobacter pylori, хенипавируса (вируса Хендра, вируса Нипах),
 вируса гепатита А, вируса гепатита В (HBV), вируса гепатита С (HCV), вируса гепатита
 D, вируса гепатита Е, вирусов простого герпеса 1 и 2 (HSV-1 и HSV-2), Histoplasma
 capsulatum, HIV (вируса иммунодефицита человека), Hortaea werneckii, бокавируса
 человека (HBoV), вируса герпеса 6 человека (HHV-6) и вируса герпеса 7 человека (HHV-
 20 7), метапневмовируса человека (hMPV), вируса папилломы человека (HPV), вирусов
 парагриппа человека (HPIV), вируса 1 Т-клеточного лейкоза человека (HTLV-1), вируса
 японского энцефалита, вируса JC, вируса Джунин, ассоциированного с саркомой Капоши
 вируса герпеса (KSHV), Kingella kingae, Klebsiella granulomatis, приона куру, вируса Ласса,
 Legionella pneumophila, рода Leishmania, рода Leptospira, Listeria monocytogenes, вируса
 25 лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), вируса Мачупо, видов Malassezia, вируса
 марбургской болезни, вируса кори, Metagonimus yokagawai, Microsporidia phylum, вируса
 контагиозного моллюска (MCV), вируса свинки, Mycobacterium leprae и Mycobacterium
 lepromatosis, Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium ulcerans, Mycoplasma pneumoniae,
 Naegleria fowleri, Necator americanus, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Nocardia
 30 asteroides, видов Nocardia, Onchocerca volvulus, Orientia tsutsugamushi, семейства
 Orthomyxoviridae (вирусов гриппа), Paracoccidioides brasiliensis, видов Paragonimus,
 Paragonimus westermani, парвовируса B19, рода Pasteurella, рода Plasmodium, Pneumocystis
 jirovecii, вируса полиомиелита, вируса бешенства, респираторно-синцитиального вируса
 (RSV), риновируса, риновирусов, Rickettsia akari, рода Rickettsia, Rickettsia prowazekii,
 35 Rickettsia rickettsii, Rickettsia typhi, вируса лихорадки долины Рифт, ротавируса, вируса
 краснухи, вируса Сабиа, рода Salmonella, Sarcoptes scabiei, коронавируса SARS, рода
 Schistosoma, рода Shigella, вируса Син Номбре, хантавируса, Sporothrix schenckii, рода
 Staphylococcus, рода Staphylococcus, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae,
 Streptococcus pyogenes, Strongyloides stercoralis, рода Taenia, Taenia solium, вируса клещевого
 40 энцефалита (TBEV), Тохосара canis или Тохосара cati, Тохопlasma gondii, Treponema pallidum,
 Trichinella spiralis, Trichomonas vaginalis, видов Trichophyton, Trichuris trichiura, Трипаносома
 brucei, Трипаносома cruzi, Ureaplasma urealyticum, вируса ветряной оспы (VZV), вируса
 ветряной оспы (VZV), вируса большой оспы или малой оспы, приона vCJD, вируса
 венесуэльского энцефалита лошадей, Vibrio cholerae, вируса лихорадки западного Нила,
 45 вируса западного энцефалита лошадей, Wuchereria bancrofti, вируса желтой лихорадки,
 Yersinia enterocolitica, Yersinia pestis и Yersinia pseudotuberculosis.

[0377] В некоторых вариантах осуществления, эффекторные клетки с abTCR
 используют для лечения онкогенных инфекционных заболеваний, таких как инфекция

онкогенными вирусами. Онкогенные вирусы включают, но без ограничения, CMV, EBV, HBV, KSHV, HPV, MCV, HTLV-1, HIV-1 и HCV. Антиген-мишень для abTCR может представлять собой вирусный онкобелок, включая, но без ограничения, белки Tax, E7, E6/E7, E6, HBx, EBNA (например, EBNA3 A, EBNA3 C, и EBNA 2), v-циклин, LANA1, LANA2, LMP-1, k-bZIP, RTA, KSHV K8 и их фрагменты. См. Ahuja, Richa, et al., Curr. Sci., 2014.

Изделия и наборы

[0378] Некоторые варианты осуществления изобретения относятся к изделию, содержащему материалы, которые можно использовать для лечения положительного по антигену-мишени заболевания, такого как злокачественная опухоль (например, аденокарцинома, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, холангиокарцинома, колоректальный рак, рак пищевода, глиобластома, глиома, печеночно-клеточная карцинома, рак головы и шеи, рак почки, рак легкого, меланома, мезотелиома, множественная миелома, рак поджелудочной железы, феохромоцитома, плазмацитома, нейробластома, рак яичника, рак предстательной железы, саркома, рак желудка, рак тела матки или рак щитовидной железы) или вирусная инфекция (например, инфекция CMV, EBV, HBV, KSHV, HPV, MCV, HTLV-1, HIV-1 или HCV). Изделие может содержать контейнер и этикетку или листовку-вкладыш на контейнере или приложенные к контейнеру. Подходящие контейнеры включают, например, флаконы, ампулы, шприцы и т.д. Контейнеры можно изготавливать из множества материалов, таких как стекло или пластик. Как правило, контейнер содержит композицию, являющуюся эффективной для лечения заболевания или нарушения, описанных в настоящем описании, и может обладать стерильным отверстием для доступа (например, контейнер может представлять собой пакет с раствором для внутривенного введения или флакон с пробкой, прокалываемой стерильной иглой для подкожных инъекций). По меньшей мере одно действующее вещество в композиции представляет собой эффекторную клетку, представляющую на своей поверхности abTCR по изобретению. На этикетке или в листовке-вкладыше указано, что композицию применяют для лечения конкретного состояния. Этикетка или листовка-вкладыш может дополнительно содержать инструкции для введения композиции эффекторной клетки с abTCR пациенту. Предусмотрены также изделия и наборы, содержащие виды комбинированной терапии, описанные в настоящем описании.

[0379] Листовка-вкладыш относится к инструкциям, обычно включаемым в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, содержащим информацию относительно показаний, применения, дозировки, введения, противопоказаний и/или предупреждений, касающихся применения таких терапевтических продуктов. В некоторых вариантах осуществления, в листовке-вкладыше указано, что композицию используют для лечения положительной по антигену-мишени злокачественной опухоли (такой как аденокарцинома, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, холангиокарцинома, колоректальный рак, рак пищевода, глиобластома, глиома, печеночно-клеточная карцинома, рак головы и шеи, рак почки, рак легкого, меланома, мезотелиома, множественная миелома, рак поджелудочной железы, феохромоцитома, плазмацитома, нейробластома, рак яичника, рак предстательной железы, саркома, рак желудка, рак тела матки или рак щитовидной железы). В других вариантах осуществления, в листовке-вкладыше указано, что композицию используют для лечения положительной по антигену-мишени вирусной инфекции (например, инфекции CMV, EBV, HBV, KSHV, HPV, MCV, HTLV-1, HIV-1 или HCV).

[0380] Кроме того, изделие может дополнительно содержать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), фосфатно-солевой буфер, раствор Рингера и раствор декстрозы. Оно может дополнительно содержать другие материалы, желательные с коммерческой или пользовательской точки зрения, включая другие буферы, растворители, фильтры, иглы и шприцы.

[0381] Изобретение относится также к наборам, которые можно использовать для различных целей, например, для лечения положительного по антигену-мишени заболевания или нарушения, описанного в настоящем описании, необязательно, в комбинации с изделиями. Наборы по изобретению включают один или несколько контейнеров, содержащих композицию (или единичную дозированную форму и/или изделие) с эффекторными клетками с abTCR, и в некоторых вариантах осуществления, дополнительно содержат другое средство (такое как средства, описанные в настоящем описании) и/или инструкции для применения в соответствии с любым из способов, описанных в настоящем описании. Набор может дополнительно содержать описание отбора индивидуумов, подходящих для лечения. Инструкции, поставляемые в наборах по изобретению, как правило, представляют собой письменные инструкции на этикетке или в листовке-вкладыше (например, на листе бумаги, включенном в набор), однако машиночитаемые инструкции (например, инструкции содержатся на магнитном или оптическом диске для хранения) также являются приемлемыми.

[0382] Например, в некоторых вариантах осуществления, набор содержит композицию, содержащую эффекторную клетку, представляющую на своей поверхности abTCR. В некоторых вариантах осуществления, набор содержит а) композицию, содержащую эффекторную клетку, представляющую на своей поверхности abTCR, и б) эффективное количество по меньшей мере одного другого средства, где другое средство увеличивает экспрессию белков МНС и/или улучшает представление пептидов на поверхности посредством белков МНС (например, IFN γ , IFN β , IFN α или ингибитор Hsp90). В некоторых вариантах осуществления, набор содержит а) композицию, содержащую эффекторную клетку, представляющую на своей поверхности abTCR, и б) инструкции для введения композиции эффекторной клетки с abTCR индивидууму для лечения положительного по антигену-мишени заболевания (такого как злокачественная опухоль или вирусная инфекция). В некоторых вариантах осуществления, набор содержит а) композицию, содержащую эффекторную клетку, представляющую на своей поверхности abTCR, б) эффективное количество по меньшей мере одного другого средства, где другое средство увеличивает экспрессию белков МНС и/или улучшает представление пептидов на поверхности посредством белков МНС (например, IFN γ , IFN β , IFN α или ингибитор Hsp90), и с) инструкции для введения композиции эффекторной клетки с abTCR и другого средства(средств) индивидууму для лечения положительного по антигену-мишени заболевания (такого как злокачественная опухоль или вирусная инфекция). Композиция эффекторной клетки с abTCR и другое средство(средства) могут присутствовать в отдельных контейнерах или в одном контейнере. Например, набор может содержать одну отдельную композицию или две или более композиции, где одна композиция содержит эффекторную клетку с abTCR, и другая композиция содержит другое средство.

[0383] В некоторых вариантах осуществления, набор содержит а) композицию, содержащую abTCR, и б) инструкции для объединения abTCR с эффекторными клетками (такими как эффекторные клетки, например, Т-клетки или клетки естественные киллеры, полученные от индивидуума) для получения композиции, содержащей эффекторные

клетки, представляющие на своей поверхности абTCR, и введение композиции эффекторной клетки с абTCR индивидууму для лечения положительного по антигену-мишени заболевания (такого как злокачественная опухоль или вирусная инфекция). В некоторых вариантах осуществления, набор содержит а) композицию, содержащую абTCR, и б) эффекторную клетку (такую как цитотоксическая клетка). В некоторых вариантах осуществления, набор содержит а) композицию, содержащую абTCR, б) эффекторную клетку (такую как цитотоксическая клетка) и с) инструкции для объединения абTCR с эффекторной клеткой для получения композиции, содержащей эффекторную клетку, представляющую на своей поверхности абTCR, и введения композиции эффекторной клетки с абTCR индивидууму для лечения положительного по антигену-мишени заболевания (такого как злокачественная опухоль или вирусная инфекция).

[0384] В некоторых вариантах осуществления, набор содержит нуклеиновую кислоту (или группу нуклеиновых кислот), кодирующую абTCR. В некоторых вариантах осуществления, набор содержит а) нуклеиновую кислоту (или группу нуклеиновых кислот), кодирующую абTCR, и б) клетку-хозяина (такую как эффекторная клетка) для экспрессии нуклеиновой кислоты (или группы нуклеиновых кислот). В некоторых вариантах осуществления, набор содержит а) нуклеиновую кислоту (или группу нуклеиновых кислот), кодирующую абTCR, и б) инструкции для i) экспрессии абTCR в клетке-хозяине (такой как эффекторная клетка, например, Т-клетка), ii) получения композиции, содержащей клетку-хозяина, экспрессирующую абTCR, и iii) введения композиции, содержащей клетку-хозяина, экспрессирующую абTCR, индивидууму для лечения положительного по антигену-мишени заболевания (такого как злокачественная опухоль или вирусная инфекция). В некоторых вариантах осуществления, клетка-хозяин получена от индивидуума. В некоторых вариантах осуществления, набор содержит а) нуклеиновую кислоту (или группу нуклеиновых кислот), кодирующую абTCR, б) клетку-хозяина (такую как эффекторная клетка) для экспрессии нуклеиновой кислоты (или группы нуклеиновых кислот), и с) инструкции для i) экспрессии абTCR в клетке-хозяине, ii) получения композиции, содержащей клетку-хозяина, экспрессирующую абTCR, и iii) введения композиции, содержащей клетку-хозяина, экспрессирующую абTCR, индивидууму для лечения положительного по антигену-мишени заболевания (такого как злокачественная опухоль или вирусная инфекция).

[0385] Наборы по изобретению находятся в подходящей упаковке. Подходящая упаковка включает, но без ограничения, флаконы, бутылки, банки, гибкую упаковку (например, герметично закрытые майларовые или пластиковые пакеты) и т.п. Наборы могут, необязательно, обеспечивать дополнительные компоненты, такие как буферы, и пояснительную информацию. Настоящая заявка, таким образом, относится также к изделиям, которые включают флаконы (такие как герметично закрытые флаконы), бутылки, банки, гибкую упаковку и т.п.

[0386] Инструкции относительно применения композиций эффекторных клеток с абTCR, как правило, включают информацию относительно дозировки, расписания дозирования и способа введения для намеченного лечения. Контейнеры могут содержать единичные дозы, упаковки большого объема (например, многодозовые упаковки) или части единичных доз. Например, можно предоставлять наборы, содержащие достаточные дозы композиции эффекторных клеток с абTCR, как описано в настоящем описании, для обеспечения эффективного лечения индивидуума в течение длительного периода, такого как любой из недели, 8 суток, 9 суток, 10 суток, 11 суток, 12 суток, 13 суток, 2 недель, 3 недель, 4 недель, 6 недель, 8 недель, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев,

7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев или более. Наборы могут также включать множество единичных доз abTCR и фармацевтические композиции и инструкции для применения, и могут быть упакованы в количествах, достаточных для хранения и применения в аптеках, например, больничных аптеках и аптеках с рецептурно-производственным отделом.

[0387] Специалисту в данной области понятно, что несколько вариантов осуществления возможны в пределах объема и содержания этого изобретения. Изобретение в настоящее время описано более подробно применительно к следующим неограничивающим примерам. Следующие примеры дополнительно иллюстрируют изобретение, однако, разумеется, их не следует рассматривать как ограничивающие его объем каким-либо образом.

Иллюстративные варианты осуществления

[0388] Вариант осуществления 1. Химерная молекула (abTCR) антитело-T-клеточный рецептор (TCR), специфически связывающая антиген-мишень, содержащая:

а) первую полипептидную цепь, содержащую первый антигенсвязывающий домен, содержащий домены V_H и C_H1 антитела, и первый домен T-клеточного рецептора (TCRD), содержащий первый трансмембранный домен первой субъединицы TCR; и

б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй антигенсвязывающий домен, содержащий домены V_L и C_L антитела, и второй TCRD, содержащий второй трансмембранный домен второй субъединицы TCR,

где домены V_H и C_H1 первого антигенсвязывающего домена и домены V_L и C_L второго антигенсвязывающего домена формируют антигенсвязывающий модуль, специфически связывающий антиген-мишень,

и где первый TCRD и второй TCRD формируют модуль T-клеточного рецептора (TCRM), способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль.

[0389] Вариант осуществления 2. abTCR из варианта осуществления 1, где антигенсвязывающий модуль содержит дисульфидную связь между остатком в домене C_H1 и остатком в домене C_L .

[0390] Вариант осуществления 3. abTCR из варианта осуществления 1 или 2, где первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый пептидный линкер между первым антигенсвязывающим доменом и первым TCRD.

[0391] Вариант осуществления 4. abTCR из любого из вариантов осуществления 1-3, где вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй пептидный линкер между вторым антигенсвязывающим доменом и вторым TCRD.

[0392] Вариант осуществления 5. abTCR из варианта осуществления 3 или 4, где первый пептидный линкер и/или второй пептидный линкер имеют длину, индивидуально, от приблизительно 5 до приблизительно 50 аминокислот.

[0393] Вариант осуществления 6. abTCR из любого из вариантов осуществления 1-5, где антиген-мишень представляет собой антиген клеточной поверхности.

[0394] Вариант осуществления 7. abTCR из варианта осуществления 6, где антиген клеточной поверхности выбран из группы, состоящей из белка, углевода и липида.

[0395] Вариант осуществления 8. abTCR из варианта осуществления 7, где антиген клеточной поверхности представляет собой CD19, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D или FCRL5.

[0396] Вариант осуществления 9. abTCR из любого из вариантов осуществления 1-5, где антиген-мишень представляет собой комплекс, содержащий пептид и белок главного

комплекса гистосовместимости (МНС).

[0397] Вариант осуществления 10. abTCR, специфически связывающий антиген-мишень, содержащий:

а) первую полипептидную цепь, содержащую первый антигенсвязывающий домен, содержащий домен V_H антитела, и первый TCRD, содержащий первый трансмембранный домен первой субъединицы TCR; и

б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй антигенсвязывающий домен, содержащий домены V_L антитела, и второй TCRD, содержащий второй трансмембранный домен второй субъединицы TCR,

где домен V_H первого антигенсвязывающего домена и домен V_L второго антигенсвязывающего домена формируют антигенсвязывающий модуль, специфически связывающий антиген-мишень,

где первый TCRD и второй TCRD формируют модуль Т-клеточного рецептора (TCRM), способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль, и

где антиген-мишень представляет собой комплекс, содержащий пептид и белок МНС.

[0398] Вариант осуществления 11. abTCR из варианта осуществления 10, где первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый пептидный линкер между первым антигенсвязывающим доменом и первым TCRD, и вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй пептидный линкер между вторым антигенсвязывающим доменом и вторым TCRD.

[0399] Вариант осуществления 12. abTCR из варианта осуществления 11, где первый и/или второй пептидные линкеры содержат, индивидуально, константный домен или его фрагмент из иммуноглобулина или субъединицы Т-клеточного рецептора.

[0400] Вариант осуществления 13. abTCR из варианта осуществления 12, где первый и/или второй пептидные линкеры содержат, индивидуально, домен CH1, CH2, CH3, CH4 или C_L антитела, или его фрагмент.

[0401] Вариант осуществления 14. abTCR из варианта осуществления 12, где первый и/или второй пептидные линкеры содержат, индивидуально, домен $C\alpha$, $C\beta$, $C\gamma$ или $C\delta$ TCR, или его фрагмент.

[0402] Вариант осуществления 15. abTCR из любого из вариантов осуществления 1-14, где первый TCRD дополнительно содержит первый соединительный пептид или его фрагмент из субъединицы TCR с N-конца от первого трансмембранного домена.

[0403] Вариант осуществления 16. abTCR из любого из вариантов осуществления 1-15, где второй TCRD дополнительно содержит второй соединительный пептид или его фрагмент из субъединицы TCR с N-конца от второго трансмембранного домена.

[0404] Вариант осуществления 17. abTCR из варианта осуществления 15 или 16, где TCRM содержит дисульфидную связь между остатком в первом соединительном пептиде и остатком во втором соединительном пептиде.

[0405] Вариант осуществления 18. abTCR из любого из вариантов осуществления 1-17, где первый TCRD дополнительно содержит первый внутриклеточный домен TCR, содержащий внутриклеточную последовательность TCR с C-конца от первого трансмембранного домена.

[0406] Вариант осуществления 19. abTCR из любого из вариантов осуществления 1-18, где второй TCRD дополнительно содержит второй внутриклеточный домен TCR, содержащий внутриклеточную последовательность TCR с C-конца от второго трансмембранного домена.

[0407] Вариант осуществления 20. abTCR из любого из вариантов осуществления 1-19, где первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий костимулирующую внутриклеточную передающую сигналы последовательность с С-конца от первого трансмембранного домена.

5 [0408] Вариант осуществления 21. abTCR из любого из вариантов осуществления 1-20, где вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий костимулирующую внутриклеточную передающую сигналы последовательность с С-конца от второго трансмембранного домена.

[0409] Вариант осуществления 22. abTCR из любого из вариантов осуществления 1-10 21, где первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с N-конца от первого антигенсвязывающего домена.

[0410] Вариант осуществления 23. abTCR из любого из вариантов осуществления 1-22, где вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с N-конца от второго антигенсвязывающего домена.

15 [0411] Вариант осуществления 24. abTCR из любого из вариантов осуществления 9-23, где пептид в комплексе антигена-мишени происходит из белка, выбранного из группы, состоящей из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1 и PSA.

[0412] Вариант осуществления 25. abTCR из любого из вариантов осуществления 1-20 24, где молекула связывает антиген-мишень с равновесной константой диссоциации (K_d) от приблизительно 0,1 пМ до приблизительно 500 нМ.

[0413] Вариант осуществления 26. abTCR из любого из вариантов осуществления 1-25, где ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль выбран из группы, состоящей из CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\gamma\epsilon$ и $\zeta\zeta$.

25 [0414] Вариант осуществления 27. abTCR из любого из вариантов осуществления 1-26, где первая субъединица TCR представляет собой цепь α TCR, и вторая субъединица TCR представляет собой цепь β TCR.

[0415] Вариант осуществления 28. abTCR из любого из вариантов осуществления 1-30 26, где первая субъединица TCR представляет собой цепь β TCR, и вторая субъединица TCR представляет собой цепь α TCR.

[0416] Вариант осуществления 29. abTCR из любого из вариантов осуществления 1-26, где первая субъединица TCR представляет собой цепь γ TCR, и вторая субъединица TCR представляет собой цепь δ TCR.

35 [0417] Вариант осуществления 30. abTCR из любого из вариантов осуществления 1-26, где первая субъединица TCR представляет собой цепь δ TCR, и вторая субъединица TCR представляет собой цепь γ TCR.

[0418] Вариант осуществления 31. Нуклеиновая кислота (кислоты), кодирующая первую и вторую полипептидные цепи abTCR из любого из вариантов осуществления 1-30.

40 [0419] Вариант осуществления 32. Комплекс, содержащий abTCR из любого из вариантов осуществления 1-30 и по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль, выбранный из группы, состоящей из CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\gamma\epsilon$ и $\zeta\zeta$.

[0420] Вариант осуществления 33. Комплекс из варианта осуществления 32, где комплекс представляет собой октамер, содержащий abTCR и CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\gamma\epsilon$, и $\zeta\zeta$.

45 [0421] Вариант осуществления 34. Эффекторная клетка, представляющая на своей поверхности abTCR из любого из вариантов осуществления 1-30 или комплекс из варианта осуществления 32 или 33.

[0422] Вариант осуществления 35. Эффекторная клетка, содержащая нуклеиновую

кислоту (кислоты) из варианта осуществления 31.

[0423] Вариант осуществления 36. Эффекторная клетка из варианта осуществления 34 или 35, где эффекторная клетка не экспрессирует первую субъединицу TCR и/или вторую субъединицу TCR.

5 [0424] Вариант осуществления 37. Эффекторная клетка из варианта осуществления 36, где

а) первая субъединица TCR представляет собой TCR α , и вторая субъединица TCR представляет собой TCR β ; или

10 б) первая субъединица TCR представляет собой TCR β , и вторая субъединица TCR представляет собой TCR α ; и

где эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ Т-клетку.

[0425] Вариант осуществления 38. Эффекторная клетка из варианта осуществления 36, где

15 а) первая субъединица TCR представляет собой TCR γ , и вторая субъединица TCR представляет собой TCR δ ; или

б) первая субъединица TCR представляет собой TCR δ , и вторая субъединица TCR представляет собой TCR γ ; и

где эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ Т-клетку.

20 [0426] Вариант осуществления 39. Эффекторная клетка из любого из вариантов осуществления 34-36, где эффекторную клетку модифицируют для блокирования или уменьшения экспрессии первой субъединицы эндогенного TCR и/или второй субъединицы эндогенного TCR.

[0427] Вариант осуществления 40. Эффекторная клетка из варианта осуществления 39, где

25 а) первая субъединица TCR представляет собой TCR α , и вторая субъединица TCR представляет собой TCR β ; или

б) первая субъединица TCR представляет собой TCR β , и вторая субъединица TCR представляет собой TCR α ; и

30 где эффекторная клетка представляет собой $\alpha\beta$ Т-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии TCR α и/или TCR β .

[0428] Вариант осуществления 41. Эффекторная клетка из варианта осуществления 39, где

а) первая субъединица TCR представляет собой TCR γ , и вторая субъединица TCR представляет собой TCR δ ; или

35 б) первая субъединица TCR представляет собой TCR δ , и вторая субъединица TCR представляет собой TCR γ ; и

где эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ Т-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии TCR γ и/или TCR δ .

[0429] Вариант осуществления 42. Эффекторная клетка из любого из вариантов

40 осуществления 34-41, где эффекторная клетка представляет собой CD3⁺ клетку.

[0430] Вариант осуществления 43. Эффекторная клетка из варианта осуществления 42, где CD3⁺ клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической Т-клетки, Т-клетки-помощника, Т-клетки - естественного киллера и супрессорной Т-клетки.

45 [0431] Вариант осуществления 44. Эффекторная клетка из любого из вариантов осуществления 34-43, содержащая а) первый вектор, содержащий первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первую полипептидную цепь abTCR под контролем первого промотора, и б) второй вектор, содержащий вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вторую полипептидную цепь

abTCR под контролем второго промотора.

[0432] Вариант осуществления 45. Эффекторная клетка из любого из вариантов осуществления 34-43, содержащая вектор, содержащий а) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первую полипептидную цепь abTCR под контролем
5 первого промотора; и б) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вторую полипептидную цепь abTCR под контролем второго промотора.

[0433] Вариант осуществления 46. Эффекторная клетка из любого из вариантов осуществления 34-43, содержащая вектор, содержащий а) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первую полипептидную цепь abTCR, и вторую
10 последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вторую полипептидную цепь abTCR, где первая и вторая последовательности нуклеиновой кислоты находятся под контролем одного промотора.

[0434] Вариант осуществления 47. Эффекторная клетка из любого из вариантов осуществления 34-45, где экспрессия первой полипептидной цепи abTCR более, чем в
15 два раза отличается от экспрессии второй полипептидной цепи abTCR.

[0435] Вариант осуществления 48. Способ уничтожения клетки-мишени, представляющей антиген-мишень, включающий приведение клетки-мишени в контакт с эффекторной клеткой из любого из вариантов осуществления 34-47, где abTCR специфически связывает антиген-мишень.

[0436] Вариант осуществления 49. Способ уничтожения клетки-мишени, представляющей антиген-мишень, включающий приведение клетки-мишени в контакт с эффекторной $\alpha\beta$ T-клеткой, содержащей abTCR, специфически связывающий антиген-
20 мишень, содержащий:

а) первую полипептидную цепь, содержащую первый антигенсвязывающий домен, содержащий домен V_H антитела, и первый TCRD, содержащий первый трансмембранный домен первой субъединицы TCR; и
25

б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй антигенсвязывающий домен, содержащий домены V_L антитела, и второй TCRD, содержащий второй трансмембранный домен второй субъединицы TCR,
30

где домен V_H первого антигенсвязывающего домена и домен V_L второго антигенсвязывающего домена формируют антигенсвязывающий модуль, специфически связывающий антиген-мишень,

где первый TCRD и второй TCRD формируют модуль T-клеточного рецептора (TCRM), способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль, и
35

где первая субъединица TCR представляет собой TCR γ , и вторая субъединица TCR представляет собой TCR δ , или первая субъединица TCR представляет собой TCR δ , и вторая субъединица TCR представляет собой TCR γ .

[0437] Вариант осуществления 50. Способ из варианта осуществления 49, где первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый пептидный линкер между первым антигенсвязывающим доменом и первым TCRD, и вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй пептидный линкер между вторым антигенсвязывающим доменом и вторым TCRD.
40

[0438] Вариант осуществления 51. Способ из варианта осуществления 50, где первый и/или второй пептидные линкеры содержат, индивидуально, константный домен или его фрагмент из иммуноглобулина или субъединицы T-клеточного рецептора.

[0439] Вариант осуществления 52. Способ из варианта осуществления 51, где первый

и/или второй пептидные линкеры содержат, индивидуально, домен CH1, CH2, CH3, CH4 или C_L антитела, или его фрагмент.

[0440] Вариант осуществления 53. Способ из варианта осуществления 51, где первый и/или второй пептидные линкеры содержат, индивидуально, домен C α , C β , C γ , или C δ TCR, или его фрагмент.

[0441] Вариант осуществления 54. Способ из любого из вариантов осуществления 48-53, где контакт происходит *in vivo*.

[0442] Вариант осуществления 55. Способ из любого из вариантов осуществления 48-53, где контакт происходит *in vitro*.

[0443] Вариант осуществления 56. Фармацевтическая композиция, содержащая abTCR из любого из вариантов осуществления 1-30, нуклеиновую кислоту(кислоты) из варианта осуществления 31, или эффекторную клетку из любого из вариантов осуществления 34-47, и фармацевтически приемлемый носитель.

[0444] Вариант осуществления 57. Способ лечения ассоциированного с антигеном-мишенью заболевания у нуждающегося в этом индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции из варианта осуществления 51.

[0445] Вариант осуществления 58. Способ лечения ассоциированного с антигеном-мишенью заболевания у нуждающегося в этом индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей эффекторную $\alpha\beta$ T-клетку, содержащую abTCR, специфически связывающий антиген-мишень содержащий:

а) первую полипептидную цепь, содержащую первый антигенсвязывающий домен, содержащий домен V_H антитела и первый TCRD, содержащий первый трансмембранный домен первой субъединицы TCR; и

б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй антигенсвязывающий домен, содержащий домены V_L антитела, и второй TCRD, содержащий второй трансмембранный домен второй субъединицы TCR,

где домен V_H первого антигенсвязывающего домена и домен V_L второго

антигенсвязывающего домена формируют антигенсвязывающий модуль, специфически связывающий антиген-мишень,

где первый TCRD и второй TCRD формируют модуль T-клеточного рецептора (TCRM), способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль, и

где первая субъединица TCR представляет собой TCR γ , и вторая субъединица TCR представляет собой TCR δ , или первая субъединица TCR представляет собой TCR δ , и вторая субъединица TCR представляет собой TCR γ .

[0446] Вариант осуществления 59. Способ из варианта осуществления 58, где первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый пептидный линкер между первым антигенсвязывающим доменом и первым TCRD, и вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй пептидный линкер между вторым антигенсвязывающим доменом и вторым TCRD.

[0447] Вариант осуществления 60. Способ из варианта осуществления 59, где первый и/или второй пептидные линкеры содержат, индивидуально, константный домен или его фрагмент из иммуноглобулина или субъединицы T-клеточного рецептора.

[0448] Вариант осуществления 61. Способ из варианта осуществления 60, где первый и/или второй пептидные линкеры содержат, индивидуально, домен CH1, CH2, CH3, CH4 или C_L антитела, или его фрагмент.

[0449] Вариант осуществления 62. Способ из варианта осуществления 60, где первый и/или второй пептидные линкеры содержат, индивидуально, домен С α , С β , С γ или С δ TCR, или его фрагмент.

5 [0450] Вариант осуществления 63. Способ из любого из вариантов осуществления 57-62, где ассоциированное с антигеном-мишенью заболевание представляет собой злокачественную опухоль.

[0451] Вариант осуществления 64. Способ из варианта осуществления 63, где злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из аденокарциномы, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака шейки матки, холангиокарциномы, колоректального рака, рака пищевода, глиобластомы, глиомы, печеночно-клеточной карциномы, рака головы и шеи, рака почки, лейкоза, лимфомы, рака легкого, меланомы, мезотелиомы, множественной миеломы, рака поджелудочной железы, феохромоцитомы, плазмацитомы, нейробластомы, рака яичника, рака предстательной железы, саркомы, рака желудка, рака тела матки и рака щитовидной железы.

[0452] Вариант осуществления 65. Способ из любого из вариантов осуществления 57-62, где ассоциированное с антигеном-мишенью заболевание представляет собой вирусную инфекцию.

[0453] Вариант осуществления 66. Способ из варианта осуществления 65, где вирусная инфекция вызвана вирусом, выбранным из группы, состоящей из цитомегаловируса (CMV), вируса Эпштейна-Барр (EBV), вируса гепатита В (HBV), ассоциированного с саркомой Капоши вируса герпеса (KSHV), вируса папилломы человека (HPV), вируса контагиозного моллюска (MCV), вируса Т-клеточного лейкоза человека (HTLV-1), HIV (вируса иммунодефицита человека) и вируса гепатита С (HCV).

25 [0454] Вариант осуществления 67. Способ обогащения гетерогенной популяции клеток по эффекторной клетке из любого из вариантов осуществления 34-47, включающий:

а) приведение гетерогенной популяции клеток в контакт с антигеном-мишенью, иммобилизованным на твердой подложке, для формирования комплексов эффекторной клетки, связанной с антигеном-мишенью, на твердой подложке; и

б) отделение комплексов от гетерогенной популяции клеток, таким образом, получение популяции клеток, обогащенной эффекторными клетками.

[0455] Вариант осуществления 68. Библиотека нуклеиновых кислот, содержащая последовательности, кодирующие множество абTCR, в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-30.

[0456] Вариант осуществления 69. Способ скрининга библиотеки нуклеиновых кислот из варианта осуществления 68 по последовательностям, кодирующим абTCR, специфические для антигена-мишени, включающий:

а) введение библиотеки нуклеиновых кислот во множество CD3⁺ клеток, так что абTCR экспрессируются на поверхности множества CD3⁺ клеток;

б) инкубацию множества CD3⁺ клеток с меченым антигеном-мишенью;

с) сбор CD3⁺ клеток, связанных с меченым антигеном-мишенью; и

д) выделение последовательностей, кодирующих абTCR, из клеток, собранных на стадии с), таким образом, идентификации абTCR, специфических для антигена-мишени.

Примеры

Материалы и способы

Образцы клеток, линии клеток и антитела

[0457] Линии клеток HepG2 (ATCC HB-8065; HLA-A2+, AFP⁺), SK-HEP-1 (ATCC HTB-52; HLA-A2+, AFP⁻), Raji (ATCC CCL-86; CD19⁺), CA46 (ATCC CRL-1648; CD19⁺), Jurkat (ATCC CRL-2899, CD19⁻), J.RT3-T3.5 (ATCC TIB-153), Jeko-1 (ATCC CRL-3006; CD19⁺), THP-1 (ATCC TIB-202, CD19⁻), Daudi (ATCC CCL-213; CD19⁺), HeLa (ATCC CCL-2), MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) и MCF-7 (ATCC HTB-22) получены из Американской коллекции типовых культур. Jurkat представляет собой линию клеток Т-лимфоцитов человека, происходящих из Т-клеточного лейкоза. J.RT3-T3.5 представляет собой мутантную линию, происходящую из клеток Jurkat, лишенных β-цепи Т-клеточного рецептора. Raji представляет собой линию клеток лимфомы Беркитта, экспрессирующих CD19. Линию Raji-нокаут CD19 (Raji-CD19KO) получали посредством технологии CRISPR. Три различных направляющих последовательности разработаны для нацеливания на CD19 в клетках Raji. Вектор CRISPR-Cas9 закупили из Origene, и каждую направляющую последовательность клонировали отдельно в вектор pCas-Guide. Через трое суток после электропорации, эффективность нокаута посредством каждой направляющей последовательности оценивали посредством проточной цитометрии, и пул с наилучшим нокаутом CD19 выбирали для клональной селекции посредством предельных разведений. В выбранном клоне подтверждали полный нокаут CD19 посредством секвенирования. Другую контрольную линию клеток, SK-HEP-1-AFP-MG, получали посредством трансдукции линии клеток SK-HEP-1 с использованием кассеты минигена, экспрессирующей пептид AFP AFP158 (SEQ ID NO: 53), что приводит к высокому уровню экспрессии комплекса AFP158/HLA-A*02:01 на клеточной поверхности. Все линии клеток культивировали в RPMI 1640 или DMEM, дополненных 10% FBS и 2 мМ глутамином при 37°C/5% CO₂.

[0458] Моноклональное Ab против HLA-A02 человека (клон BB7.2), конъюгированное с FITC или APC, и соответствующий ему контроль изотипа IgG 2b мыши, конъюгированные с FITC или APC, антитела против CD3 человека или мыши, различные субъединицы Т-клеточного рецептора человека, метку 3xFlag, метку HA, F(ab)₂ козы против IgG человека, конъюгированные с PE или FITC, и конъюгированное с флуоресцентным соединением F(ab')₂ козы против Ig мыши (Invitrogen) закупили. Антиидиотипическое антитело против специфического для AFP158/HLA-A*02:01 антитела разрабатывали и получали на собственном производстве Eureka Therapeutics. Данные проточной цитометрии собирали с использованием BD FACSCanto II и анализировали с использованием пакета программного обеспечения FlowJo.

[0459] Все пептиды закупили и синтезировали в Elim Biopharma. Пептиды обладали >90% чистотой. Пептиды растворяли в DMSO или разводили в солевом растворе при 10 мг/мл и замораживали при -80°C. Мономеры комплекса биотинилированного одноцепочечного AFP158/HLA-A*02:01 и контрольных пептидов/HLA-A*02:01 получали посредством повторного сворачивания пептидов с рекомбинантным HLA-A*02:01 и бета-2 микроглобулином (β2M). Мономеры биотинилировали посредством пептида BSP, сцепленного с С-концом внеклеточного домена (ECD) HLA-A*02:01 посредством фермента BirA. Меченный флуоресцентным соединением стрептавидин смешивали с мономером комплекса биотинилированного пептида/HLA-A*02:01 с формированием тетрамера меченного флуоресцентным соединением пептида/HLA-A*02:01.

[0460] Lentивирусы, содержащие CAR или abTCR, специфические для CD19 человека или специфические для AFP158/HLA-A*02:01, получали, например, посредством трансфекции клеток 293Т с использованием векторов, кодирующих химерные конструкции. Первичные Т-клетки человека использовали для трансдукции после

стимуляции в течение одних суток с использованием бусин CD3/CD28 (Dynabeads®, Invitrogen) в присутствии интерлейкина-2 (IL-2) при 100 ед./мл. Концентрированные лентивирусы добавляли к Т-клеткам в покрытых ретронектином (Takara) 6-луночных планшетах в течение 96 часов. Эффективность трансдукции химерных конструкций против AFP и против CD19 оценивали посредством проточной цитометрии, с использованием биотинилированного тетрамера AFP158/HLA-A*02:01 («тетрамера AFP158») с конъюгированным с PE стрептавидином или антителом против мус, соответственно. Повторные анализы проточной цитометрии выполняли на сутки 5 и каждые 3-4 суток после.

[0461] Линии клеток трансдуцировали либо одним, либо двумя векторами, кодирующими две субъединицы конструкции abTCR. Через пять суток после трансдукции, получали лизаты клеток для Вестерн-блоттинга с использованием антитела против HA (антитела против метки HA - квалификации ChIP, Abcam) или антитела против Flag (антитела против Flag, продуцированного кроликом, Sigma).

[0462] Цитотоксичность для опухолей оценивали посредством нерадиоактивного анализа цитотоксичности LDH Cytox 96 (Promega). CD3⁺ Т-клетки получали из обогащенной по РВМС цельной крови с использованием набора для выделения Т-клеток человека EasySep Human T Cell Isolation Kit (StemCell Technologies), осуществляющего отрицательное истощение клеток, экспрессирующих CD14, CD16, CD19, CD20, CD36, CD56, CD66b, CD123, гликофорин А. Т-клетки человека активировали и размножали, например, с использованием CD3/CD28 Dynabeads (Invitrogen) в соответствии с протоколом производителя. Активированные Т-клетки (АТС) культивировали и поддерживали в среде RPMI1640 с 10% FBS плюс 100 ед./мл IL-2, и использовали на сутки 7-14. Активированные Т-клетки (эффektorные клетки) и клетки-мишени совместно культивировали в различных соотношениях эффектора к мишени (например, 2,5:1 или 5:1) в течение 16 часов и анализировали по цитотоксичности.

Пример 1. Виды дизайна химеры антитело-Т-клеточный рецептор (abTCR)

[0463] Четыре различных дизайна химерной конструкции антитело-Т-клеточный рецептор (abTCR) (abTCR-3, abTCR-4, abTCR-5 и abTCR-6), включая предусмотренные варианты, показаны на фиг. 1А и 1В. В этих видах дизайна, домены тяжелой (IgV_H-IgC_{H1}) и легкой (IgV_L-IgC_L) цепей фрагмента Fab антитела являются слитыми с аминоконцом фрагментов цепи α/β или цепи γ/δ Т-клеточного рецептора, лишенных переменных и константных доменов и включающих все или часть их соединительных пептидов (области после константного домена) с формированием химерных гетеродимеров антитело-TCR, которые можно экспрессировать на поверхности Т-клеток. Домены IgV_H и IgV_L в каждом из видов дизайна abTCR определяют специфичность связывания антигена, и вместе с IgC_{H1} и IgC_L, формируют структуру, напоминающую фрагмент Fab. В нативном TCR, домены Vα/Vβ или Vδ/Vγ формируют антигенсвязывающий домен TCR. В этих видах дизайна, области Vα-Cα/Vβ-Cβ или Vδ-Cδ/Vγ-Cγ заменяют на IgV_H-IgC_{H1} или IgV_L-IgC_L, таким образом, придавая конструкции специфичность связывания антитела, с сохранением в то же время способности конструкции вступать в ассоциацию с вспомогательными молекулами в комплексе нативного TCR, такими как CD3δε, CD3γε и CD3ζζ. Эти виды дизайна отличаются от видов дизайна сTCR, описанных в Gross and Eshhar (Endowing T cells with antibody specificity using chimeric T cell receptors, FASEB J. 1992 (15):3370), где переменные домены антител связывают с константными областями TCR, заменяя только области Vα/Vβ на IgV_H/IgV_L.

[0464] В других видах дизайна abTCR, домены тяжелой (IgV_H) и легкой (IgV_L) цепи фрагмента Fv антитела, которое является специфическим для комплекса, содержащего пептид и белок МНС (рестрицированную по МНС группу антитела) сливают с аминоконцом фрагментов цепи α/β или цепи γ/δ Т-клеточного рецептора, лишенных

5
10

вариабельных доменов и включающих все или часть их соединительных пептидов (области после константного домена). В некоторых из этих видов дизайна abTCR, фрагменты цепи α/β или цепи γ/δ Т-клеточного рецептора включают все или часть константных доменов TCR. В одном таком дизайне, abTCR-7, IgV_H сливают с фрагментом TCR δ , включающим константный домен, и IgV_L сливают с фрагментом TCR γ , включающим константный домен. Эти виды дизайна отличаются от видов дизайна cTCR, описанных в Gross and Eshhar (выше), где вариабельные домены антитела предназначены для не рестрицированного по МНС связывания.

[0465] В дизайне abTCR-3 (IgV_H-IgC_H1 -TCR α/IgV_L-IgC_L -TCR β), вариабельным доменом

15

и первым константным доменом (IgV_H-IgC_H1) тяжелой цепи антитела заменяют аминоконцевую часть цепи TCR α вплоть до положения на границе с соединительным пептидом или внутри соединительного пептида в внеклеточном домене после области $V\alpha$ - $C\alpha$. Вариабельным доменом и константным доменом (IgV_L-IgC_L) соответствующей легкой цепи антитела заменяют аминоконцевую часть цепи TCR β вплоть до положения на

20

границе с соединительным пептидом или внутри соединительного пептида в внеклеточном домене после области $V\beta$ - $C\beta$. В дизайне abTCR-4 (IgV_H-IgC_H1 -TCR β/IgV_L-IgC_L -TCR α), вариабельным доменом и первым константным доменом (IgV_H-IgC_H1) тяжелой цепи антитела заменяют аминоконцевую часть цепи TCR β вплоть до положения

25

на границе с соединительным пептидом или внутри соединительного пептида в внеклеточном домене после области $V\beta$ - $C\beta$. Вариабельным доменом и константным доменом (IgV_L-IgC_L) соответствующей легкой цепи антитела заменяют аминоконцевую часть цепи TCR α вплоть до положения на границе с соединительным пептидом или

30

внутри соединительного пептида в внеклеточном домене после области $V\alpha$ - $C\alpha$. Химерные цепи α и β димеризуются посредством двух дисульфидных связей, одной между доменами IgC_L и IgC_H1 , и одной между соединительными пептидами в цепях TCR α и β . Метку 3x-Flag, необязательно, сливают с С-концом цитоплазматической области цепи TCR α , и метку HA, необязательно, сливают с С-концом цитоплазматической области цепи TCR β .

[0466] В одном из вариантов осуществления abTCR-3, одна цепь содержит последовательность из SEQ ID NO: 23 (анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-3), где домен IgV_H антитела против AFP158/HLA-A*02:01 (SEQ ID NO: 38) слит с доменом IgC_H1 (SEQ ID NO: 39), слитым с SEQ ID NO: 15, часть цепи TCR α , включая часть соединительного пептида в внеклеточном домене цепи TCR α после области $V\alpha$ - $C\alpha$, и другая цепь содержит

35

40

последовательность из SEQ ID NO: 24, где домен IgV_L антитела против AFP158/HLA-A*02:01 (SEQ ID NO: 40) слит с доменом IgC_L (SEQ ID NO: 41), слитым с SEQ ID NO: 16, карбокси-частью цепи TCR β , включая часть соединительного пептида в внеклеточном домене цепи TCR β после области $V\beta$ - $C\beta$. В одном из вариантов осуществления abTCR-4, одна цепь содержит последовательность из SEQ ID NO: 25 (анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-4), где домен IgV_L антитела против AFP158/HLA-A*02:01 (SEQ ID NO: 40) слит с доменом IgC_L (SEQ ID NO: 41), слитым с SEQ ID NO: 15, часть цепи TCR α , включая часть соединительного пептида в внеклеточном домене цепи TCR α после области $V\alpha$ -

45

С α , и другая цепь содержит последовательность из SEQ ID NO: 26, где домен IgV_H антитела против AFP158/HLA-A*02:01 (SEQ ID NO: 38) слит с доменом IgC_{H1} (SEQ ID NO: 39), слитым с SEQ ID NO: 16, карбокси-частью цепи TCR β , включая часть соединительного пептида в внеклеточном домене цепи TCR β после области V β -C β .

[0467] В дизайне abTCR-5 (IgV_H-IgC_{H1}-TCR γ /IgV_L-IgC_L-TCR δ), переменным доменом и первым константным доменом (IgV_H-IgC_{H1}) тяжелой цепи антитела заменяют аминоконцевую часть цепи TCR γ цепь вплоть до положения на границе с соединительным пептидом или внутри соединительного пептида в внеклеточном домене цепи TCR γ после области V γ -C γ . Переменным доменом и константным доменом (IgV_L-IgC_L) соответствующей легкой цепи антитела заменяют аминоконцевую часть цепи TCR δ вплоть до положения на границе с соединительным пептидом или внутри соединительного пептида в внеклеточном домене цепи TCR δ после области V δ -C δ . В дизайне abTCR-6 (IgV_H-IgC_{H1}-TCR δ /IgV_L-IgC_L-TCR γ), переменным доменом и первым константным доменом (IgV_H-IgC_{H1}) тяжелой цепи антитела заменяют аминоконцевую часть цепи TCR δ вплоть до положения на границе с соединительным пептидом или внутри соединительного пептида в внеклеточном домене цепи TCR δ после области V δ -C δ . Переменным доменом и константным доменом (IgV_L-IgC_L) соответствующей легкой цепи антитела заменяют аминоконцевую часть цепи TCR γ вплоть до положения на границе с соединительным пептидом или внутри соединительного пептида в внеклеточном домене цепи TCR γ после области V γ -C γ . Химерные цепи γ и δ димеризуются посредством двух дисульфидных связей, одной между доменами IgC_L и IgC_{H1}, и одной между соединительными пептидами в цепях TCR γ и δ . Метку 3xflag, необязательно, сливают с С-концом цитоплазматической области цепи TCR γ , и метку HA, необязательно, сливают с С-концом цитоплазматической области цепи TCR δ .

[0468] В одном из вариантов осуществления abTCR-5, одна цепь содержит последовательность из SEQ ID NO: 30 (анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-5), где домен IgV_H антитела против AFP158/HLA-A*02:01 (SEQ ID NO: 38) слит с доменом IgC_{H1} (SEQ ID NO: 39), слитым с SEQ ID NO: 20, часть цепи TCR γ , включая часть соединительного пептида в внеклеточном домене цепи TCR γ после области V γ -C γ , и другая цепь содержит последовательность из SEQ ID NO: 29, где домен IgV_L антитела против AFP158/HLA-A*02:01 (SEQ ID NO: 40) слит с доменом IgC_L (SEQ ID NO: 41) и затем с SEQ ID NO: 19, карбокси-концевую часть цепи TCR δ , включая часть соединительного пептида в внеклеточном домене цепи TCR δ после области V δ -C δ . В одном из вариантов осуществления abTCR-6, одна цепь содержит последовательность из SEQ ID NO: 34 (анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-6), где домен IgV_L антитела против AFP158/HLA-A*02:01 (SEQ ID NO: 40) слит с доменом IgC_L (SEQ ID NO: 41), слитым с SEQ ID NO: 20, часть цепи TCR γ цепь, включая часть соединительного пептида в внеклеточном домене цепи TCR γ после области V γ -C γ , и другая цепь содержит последовательность из SEQ ID NO: 33, где домен IgV_H антитела против AFP158/HLA-A*02:01 (SEQ ID NO: 38) слит с доменом IgC_{H1} (SEQ ID NO: 39), слитым с SEQ ID NO: 19, карбокси-частью цепи TCR δ , включая часть соединительного пептида в внеклеточном домене цепи TCR δ после области V δ -C δ .

[0469] Как проиллюстрировано на фиг. 1B, предусмотрены также варианты каждого из четырех видов дизайна abTCR. Такие варианты могут включать изменение длины

внуклеточного домена, такое как (i) удлинение посредством добавления остатков в участок стыка, сформированный посредством слияния IgC и TCR, или (ii) укорочение посредством делеции остатков на N-конце соединительных пептидов TCR. Одним из вариантов осуществления такого варианта abTCR-6 является abTCR-6MD, где одна цепь содержит последовательность из SEQ ID NO: 36 (анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-6MD), где домен IgV_L антитела против AFP158/HLA-A*02:01 (SEQ ID NO: 40) слит с доменом IgC_L (SEQ ID NO: 41), слитым с SEQ ID NO: 22, карбокси-концевую часть цепи TCR γ , включая более длинную (по сравнению с abTCR-6) часть соединительного пептида после области V γ -C γ в цепи TCR γ , и другая цепь содержит последовательность из SEQ ID NO: 35, где домен IgV_H антитела против AFP158/HLA-A*02:01 (SEQ ID NO: 38) слит с доменом IgC_{H1} (SEQ ID NO: 39), слитым с SEQ ID NO: 21, карбокси-концевую часть цепи TCR δ , включая более длинную (по сравнению с abTCR-6) часть соединительного пептида после области V δ -C δ в цепи TCR δ . Одним из вариантов осуществления такого варианта abTCR-5 является abTCR-5MD, где одна цепь содержит последовательность из SEQ ID NO: 31 (анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-5MD) где домен IgV_L антитела против AFP158/HLA-A*02:01 (SEQ ID NO: 40) слит с доменом IgC_L (SEQ ID NO: 41), слитым с SEQ ID NO: 21, карбокси-концевую часть цепи TCR δ , включая более длинную (по сравнению с abTCR-5) часть соединительного пептида после области V δ -C δ в цепи TCR δ , и другая цепь содержит последовательность из SEQ ID NO: 32, где домен IgV_H антитела против AFP158/HLA-A*02:01 (SEQ ID NO: 38) слит с доменом IgC_{H1} (SEQ ID NO: 39), слитым с SEQ ID NO: 22, карбокси-концевую часть цепи TCR γ , включая более длинную (по сравнению с abTCR-5) часть соединительного пептида после области V γ -C γ в цепи TCR γ . Одним из вариантов осуществления такого варианта abTCR-4 является abTCR-4MD, где одна цепь содержит последовательность из SEQ ID NO: 27 (анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-4MD) где домен IgV_L антитела против AFP158/HLA-A*02:01 (SEQ ID NO: 40) слит с доменом IgC_L (SEQ ID NO: 41), слитым с SEQ ID NO: 17, карбокси-концевую часть цепи TCR α , включая более длинную (по сравнению с abTCR-4) часть соединительного пептида после области V α -C α , и другая цепь содержит последовательность из SEQ ID NO: 28, где домен IgV_H антитела против AFP158/HLA-A*02:01 (SEQ ID NO: 38) слит с доменом IgC_{H1} (SEQ ID NO: 39), слитым с SEQ ID NO: 18, карбокси-концевую часть цепи TCR β , включая более длинную (по сравнению с abTCR-4) часть соединительного пептида после области V β -C β .

[0470] Дополнительные варианты могут включать слияние дополнительных эффекторных доменов (например, внутриклеточного домена CD28) с C-концом любой из цепей TCR $\alpha/\beta/\delta/\gamma$. Другой вариант может включать изменение линкерной области между доменами IgV и IgC.

Пример 2: Экспрессия abTCR на линиях Т-клеток

[0471] В зрелых Т-клетках, комплекс TCR-CD3 состоит из четырех димерных модулей: TCR $\alpha\beta$ (или TCR $\gamma\delta$), CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\gamma\epsilon$ и CD3 $\zeta\zeta$, которые, как считают, являются ассоциированными посредством контактов внутри мембраны и вне мембраны с формированием интактного комплекса, как показано на фиг. 2 (из Wucherpfennig KW, et al., Structural biology of the T-cell receptor: insights into receptor assembly, ligand recognition, and initiation of signaling. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010 Apr; 2(4):a005140). Сборка комплекса происходит в эндоплазматическом ретикулуме (ER). Только полные комплексы TCR-CD3 подвергаются переносу в аппарат Гольджи, где они проходят через процесс гликозилирования и подвергаются транспорту к плазматической мембране

Т-клеток. Неполные TCR направляются из Гольджи в лизосомы, где они подвергаются деградации.

[0472] Для тестирования экспрессии abTCR в Т-клетках и для проверки того, могут ли abTCR функционировать подобно эндогенным TCR при привлечении молекул CD3 и обеспечении экспрессии комплекса abTCR-CD3 на Т-клеточной поверхности, конструкции abTCR вводили в мутантную линию Т-клеток, J.RT3-T3.5. В отличие от Jurkat, положительная по $\alpha\beta$ TCR линия Т-клеточного лейкоза, J.RT3-T3.5 представляет собой мутантную линию Jurkat, лишенную экспрессии β -субъединицы TCR. Поскольку сборка комплекса TCR-CD3 нарушена без β -субъединицы TCR, ни TCR, ни CD3 не могут транспортироваться к плазматической мембране в клетках J.RT3-T3.5.

Детекция экспрессии abTCR посредством Вестерн-блоттинга

[0473] Пять групп конструкций abTCR (abTCR-3, -4, -5, -6, -6MD) получали с областями IgV_H и IgV_L антитела против AFP158/HLA-A*02:01. J.RT3-T3.5, и клетки Jurkat трансдуцировали с использованием конструкций abTCR-3 (SEQ ID NO: 23 и 24), abTCR-4 (SEQ ID NO: 25 и 26), abTCR-5 (SEQ ID NO: 29 и 30), abTCR-6 (SEQ ID NO: 33 и 34) или abTCR-6MD (SEQ ID NO: 35 и 36), и экспрессию индивидуальных субъединиц abTCR детектировали посредством Вестерн-блоттинга с использованием антител против Flag или против HA (ФИГ. 3). Для каждой конструкции, две субъединицы субклонировали в отдельные лентивирусные векторы. Для экспрессии полного гетеродимера abTCR, Т-клетки трансдуцировали с использованием обоих векторов. Химеры TCR β и TCR δ метили с использованием HA, в то время как химеры TCR α и TCR γ метили с использованием 3xFlag, присоединенного к С-концам субъединиц abTCR. Цепи TCR, несущие HA- или 3xFlag-метки, указаны в скобках на фиг. 3, под обозначением каждого дизайна abTCR.

[0474] Среди меченных HA химер как в J.RT3-T3.5, так и в Jurkat (ФИГ. 3, панели антител против HA), наивысшая экспрессия показана для субъединицы IgV_L-IgC_L-TCR β в abTCR-3, за которой следует субъединица IgV_H-IgC_{H1}-TCR δ в abTCR-6 и abTCR-6MD, и субъединица IgV_H-IgC_{H1}-TCR β в abTCR-4. Среди меченных 3xFlag химер (ФИГ. 3, панели антител против flag), наивысшую экспрессию наблюдали для IgV_L-IgC_L-TCR γ в abTCR-6 и abTCR-6MD, за которым следует IgV_L-IgC_L-TCR α в ab-TCR-4. Для обеих цепей для abTCR-5 (IgV_H-IgC_{H1}-TCR γ /IgV_L-IgC_L-TCR δ) показана наиболее низкая экспрессия среди 5 групп тестированных конструкций. Цепь TCR δ для abTCR-6MD экспрессировалась на уровне, сходном с abTCR6, в то время как цепь TCR γ для abTCR-6MD экспрессировалась на более низком уровне, чем наблюдали для abTCR6. Как процент трансдуцированных клеток, так и уровень экспрессии в трансдуцированных клетках, вносили вклад в сигналы, детектированные на Вестерн-блотах. Таким образом, затем проводили проточную цитометрию для определения уровня экспрессии abTCR на клеточной поверхности.

Детекция экспрессии abTCR на клеточной поверхности и формирования комплекса TCR-CD3 посредством проточной цитометрии

[0475] 5 парами химерных цепей abTCR, описанных выше (abTCR-3, -4, -5, -6, -6MD), индивидуально трансдуцировали клетки J.RT3-T3.5 (ФИГ. 4A-4C) и Jurkat (ФИГ. 5A-5C). Клетки, трансдуцированные с использованием конструкций abTCR, оценивали посредством следующего: (i) антитело против CD3 ϵ для оценки экспрессии CD3 ϵ на клетках J.RT3-T3.5 (ФИГ. 4A), (ii) антитело против TCR $\alpha\beta$ для оценки влияния конструкций abTCR на эндогенную экспрессию TCR $\alpha\beta$ на клетках Jurkat (ФИГ. 5A), (iii) меченный PE-тетрамер AFP158/HLA-A*02:01 для оценки связывания антигена

трансдуцированными конструкциями abTCR (ФИГ. 4В и 5В) и (iv) антиидиотипическое антитело против AFP158/HLA-A*02:01, используемое в химерах abTCR (ФИГ. 4С и 5С) для оценки поверхностной экспрессии химерных конструкций.

5 [0476] В случае клеток J.RT3-T3.5, ложная трансдукция не обеспечивала связывание с тетрамерами AFP158/HLA-A*02:01 и антиидиотипическим антителом и не приводило к экспрессии CD3ε на клеточной поверхности (ФИГ. 4А-4С). Антиидиотипическое антитело детектировало плечо, расширяющееся от отрицательного по abTCR пика, для клеток J.RT3-T3.5, трансдуцированных с использованием abTCR-3 и abTCR-4. В отличие от этого, для клеток, трансдуцированных с использованием abTCR-5, -6 и -6MD, 10 показаны отдельные пики с высокой интенсивностью флуоресценции при окрашивании с использованием антиидиотипического антитела (ФИГ. 4С). Конструкции abTCR являются функциональными в том, что являются способными связывать тетрамер антиген-мишень AFP158 (ФИГ. 4В). Более крупная популяция клеток экспрессировала конструкции abTCR-6MD по сравнению с abTCR-6, как доказано по более высокому пику, положительному по тетрамеру AFP158, при abTCR-6MD. Однако, клетки, 15 трансдуцированные abTCR-6MD, по-видимому, экспрессировали количество копий на клетку, сходное с клетками, трансдуцированными abTCR-6, поскольку положительные по тетрамеру AFP158 пики обладали сходной средней интенсивностью флуоресценции (MFI). Кроме того, экспрессия конструкций abTCR восстанавливала экспрессию CD3ε на клеточной поверхности клеток J.RT3-T3.5 (ФИГ. 4А). Это является неожиданным, поскольку константным доменам TCR приписывали взаимодействие с цепями CD3 (обзор приведен в Kuhns and Davis, TCR Signaling Emerges from the Sum of Many Parts, Front Immunol. 2012; 3: 159, Wang and Reinherz, The structural basis of αβ T-lineage immune recognition: TCR docking topologies, mechanotransduction, and co-receptor function, Immunol Rev. 2012, 250:102). Поскольку в химерах константные домены TCR заменены на IgC, 25 авторы настоящего изобретения показали, что константный домен TCR не является необходимым для сборки CD3 с комплексом TCR. Когда трансдуцированные abTCR-6 и abTCR-6MD клетки совместно окрашивали с использованием антител против CD3ε и тетрамеров AFP158/HLA-A*02:01 и анализировали посредством проточной цитометрии, 30 авторы настоящего изобретения подтвердили, что клетки CD3ε⁺ J.RT3-T3.5 являются также положительными по тетрамеру AFP158 (ФИГ. 6). Это показывает, что экзогенные химеры abTCR формируют функциональные рецепторы, которые могут связывать их родственные антигены, и восстанавливать экспрессию комплекса CD3 на клеточной поверхности клеток J.RT3-T3.5.

35 [0477] Такую же группу экспериментов проводили также на клетках Jurkat (положительной по TCR αβ линии Т-клеток), с использованием конструкций abTCR-3, -4, -5, -6 и -6MD с антителом против AFP158/HLA-A*02:01 (ФИГ. 5А-5С). Результаты согласуются с результатами, наблюдаемыми для клеток J.RT3-T3.5 в отношении окрашивания тетрамера AFP158 (ФИГ. 5В) и связывания антиидиотипического антитела 40 (ФИГ. 5С). Трансдуцированные клетки окрашивали также с использованием антитела против TCRα/β для определения влияния конструкций abTCR на экспрессию эндогенных цепей TCRα/β. В то время как клетки Jurkat после ложной трансдукции экспрессировали высокий уровень TCRα/β, отрицательную по TCRα/β популяцию детектировали в каждом из трансдуцированных abTCR клеток как плечо слева от пика TCRα/β (ФИГ. 5А). Эти 45 данные позволяют предполагать, что экспрессия химер abTCR конкурирует за цепи CD3, что приводит к уменьшению экспрессии эндогенного TCRα/β на поверхности.

[0478] Объединяя наблюдения из экспериментов вестерн-блоттинга и проточной цитометрии, авторы настоящего изобретения постулировали, что в трансдуцированных

abTCR-3 и -4 клетках, некоторые из эндогенных субъединиц TCR α могут спариваться с экзогенными β -цепями химеры abTCR, с формированием комплексов TCR-CD3, которые могут транспортироваться к клеточной поверхности. Альтернативно, abTCR-3 и -4 могут иметь различные конформации, ограничивающие экспонирование эпитопа для антиидиотипического антитела. В трансдуцированных abTCR-3 клетках J.RT3-T3.5 и Jurkat, высокий уровень экспрессии цепи IgV_L-IgC_L-TCR β (по вестерн-блоттингу, ФИГ. 3) приводил к высокому проценту клеток J.RT3-T3.5, экспрессирующих CD3 ϵ на клеточной поверхности (ФИГ. 4А), и к уменьшению экспрессии эндогенного TCR α/β в подгруппе клеток Jurkat, трансдуцированных с использованием abTCR-3. В клетках, трансдуцированных abTCR-4, цепь IgV_H-IgC_H1-TCR β также приводила к экспрессии CD3 ϵ в клетках J.RT3-T3.5 и к уменьшению эндогенной экспрессии TCR α/β в клетках Jurkat, но до намного меньшей степени, поскольку экспрессия химерной цепи abTCR β намного ниже для abTCR-4 по сравнению с abTCR-3 (по вестерн-блоттингу, ФИГ. 3).

[0479] В случае клеток, трансдуцированных abTCR-3 и -4, ожидают, что спаривание экзогенной химеры TCR β с эндогенными цепями TCR α в TCR $\alpha\beta$ ⁺ Т-клетках уменьшает пул химерных цепей TCR β , доступных для корректного спаривания с экзогенными химерными цепями TCR α . Это не является проблемой для TCR $\alpha\beta$ ⁺ Т-клеток при экспрессии конструкций abTCR-5, -6 или -6MD, где химеры образуются с использованием цепей TCR δ и TCR γ . Высокая MFI в положительных по abTCR пиках согласуется с большим количеством правильно спаренных химер в клетках как J.RT3-T3.5, так и Jurkat, экспрессирующих конструкции abTCR-5, -6 или -6MD. И наоборот, использование конструкций abTCR-3 и -4, где химеры образуются с использованием цепей TCR α и TCR β , экспрессия в TCR $\delta\gamma$ ⁺ Т-клетках может являться предпочтительной для исключения спаривания экзогенных химерных цепей с эндогенными цепями TCR δ и TCR γ .

Пример 3. Экспрессия abTCR в первичных Т-клетках

[0480] Показав, что конструкции abTCR можно успешно трансдуцировать в линии Т-клеток и экспрессировать на клеточной поверхности вместе с комплексом CD3 в форме функциональных антигенсвязывающих рецепторов, авторы настоящего изобретения затем тестировали экспрессию abTCR в первичных Т-клетках.

abTCR экспрессирован в CD4⁺ и CD8⁺ первичных Т-клетках

[0481] Лимфоциты периферической крови выделяли от здоровых доноров и трансдуцировали с использованием конструкции abTCR-6MD, кодирующей связывающую группу против AFP158/HLA-A*02:01 (SEQ ID NO: 35 и 36). Субъединицы abTCR γ и δ субклонировали в такой же лентивирусный вектор для трансдукции первичных Т-клеток человека. Через 5 суток после трансдукции, abTCR-Т-клетки и подвергнутые ложной трансдукции клетки совместно окрашивали с использованием тетрамера AFP158 и антител против CD4, и CD8, и анализировали посредством проточной цитометрии. На ФИГ. 7А показан график рассеяния для связывания CD8 по сравнению с антигеном (AFP158 тетрамером), в то время как на ФИГ. 7В показаны графики рассеяния для CD8 по сравнению с CD4. В подвергнутых ложной трансдукции Т-клетках, соотношение CD4:CD8 составляет приблизительно 2:1 (ФИГ. 7В, верхняя панель). Такое же соотношение CD4:CD8 наблюдали в клетках, трансдуцированных с использованием конструкции abTCR-6MD (ФИГ. 7В, средняя панель). Авторы настоящего изобретения обнаружили, что соотношение CD4:CD8 также составляет приблизительно 2:1 среди тетрамер AFP158⁺ популяции в трансдуцированных abTCR-6MD клетках (см. ФИГ. 7В, нижняя панель, и отбор на фиг. 7А). Это показывает, что химеру abTCR можно

экспрессировать на как CD4⁺, так и CD8⁺ первичных Т-клетках.

Экзогенные цепи abTCR являются физически ассоциированными с комплексом CD3

[0482] С учетом того, что экспрессия abTCR в линиях Т-клеток являлась способной
 5 восстанавливать поверхностную экспрессию CD3ε в клетках J.RT3-T3.5, авторы
 настоящего изобретения тестировали, являются ли конструкции abTCR,
 экспрессированные в первичных Т-клетках, физически ассоциированными с
 индивидуальными цепями в комплексе CD3, посредством совместной
 иммунопреципитации (co-ip). Первичные Т-клетки стимулировали с использованием
 10 антител против CD3 и против CD28, и затем подвергали ложной трансдукции или
 трансдуцировали с использованием конструкций abTCR-6MD, кодирующих
 связывающую группу против AFP158/HLA-A*02:01 (SEQ ID NO: 35 и 36). Через
 двенадцать суток после трансдукции, abTCR-Т-клетки совместно культивировали с SK-
 HEP-1-AFP-MG в течение следующих 12 суток для обогащения по тетрамер AFP158+
 15 клеткам. Затем клетки лизировали с использованием буфера для лизиса с дигитонином
 (0,1%), и антитело против Flag использовали для i.p. цепи TCRγ посредством метки
 3xFlag. Как показано на фиг. 8, цепи CD3δ, CD3ε, CD3γ и CD3ζ подвергались совместной
 иммунопреципитации с химерой abTCRγ, показывая, что трансдуцированные abTCR
 химеры являлись физически ассоциированным с эндогенным комплексом CD3. Полоса
 20 с более высокой MW, чем CD3ε, наблюдаемая в подвергнутом ложной трансдукции
 образце при иммунопреципитации с использованием антитела против Flag, представляет
 собой неспецифическую полосу.

[0483] Сходные эксперименты по совместной иммунопреципитации выполняли для
 линий клеток JRT3-T3.5 и Jurkat. Линии клеток JRT3-T3.5 и Jurkat трансдуцировали с
 25 использованием конструкций abTCR-6MD, кодирующих связывающую группу против
 AFP158/HLA-A*02:01 (SEQ ID NO: 35 и 36). Через 5 суток после трансдукции, набор для
 связывания с биотином CELLection использовали для очистки популяций тетрамер
 AFP158+ из линий клеток JRT3-T3.5 и Jurkat. Клетки Jurkat и JRT3-T3.5,
 трансдуцированные с использованием abTCR-6MD и очищенные с использованием
 30 тетрамера AFP158, названы Jurkat-abTCR-pure и JRT3-T3.5-abTCR-pure, соответственно.
 Клетки JRT3-T3.5, JRT3-T3.5-abTCR-pure, Jurkat и Jurkat-abTCR-pure подвергали
 размножению и лизировали в буфере для лизиса с 0,1% дигитонином. Совместную
 иммунопреципитацию проводили с использованием антитела против Flag (Sigma) и
 Dynabeads с белком G для иммунопреципитации (Life Technologies), следуя стандартному
 способу.

35 Пример 4. Характеризация видов биологической активности Т-клеток,
 трансдуцированных с использованием конструкций abTCR-6MD и CAR, содержащих
 одинаковые вариabельные домены против AFP158/HLA-A*02:01

Трансдуцированные Т-клетки с abTCR могут специфически уничтожать
 40 положительные по антигену злокачественные клетки

[0484] Первичные Т-клетки подвергали ложной трансдукции или трансдуцировали
 с использованием лентивирусных векторов, кодирующих CAR, содержащий scFv против
 AFP158/HLA-A*02:01 (SEQ ID NO: 37) или abTCR-6MD, содержащий одинаковые
 вариabельные домены против AFP158/HLA-A*02:01 (SEQ ID NO: 35 и 36). Эффективность
 45 трансдукции определяли посредством окрашивания с использованием меченных PE
 AFP158/HLA-A*02:01 тетрамеров (ФИГ. 9А). Популяции Т-клеток со сходной частотой
 трансдукции (32% для CART и 34% для abTCR) использовали для тестирования их
 способности уничтожать линии злокачественных клеток. Использовали три линии
 клеток: HepG2 (AFP+/HLA-A2+), SK-HEP-1 (AFP-/HLA-A2+) и SK-HEP-1-AFP-MG (SK-

HEP-1, трансдуцированные с использованием минигена AFP) при соотношении эффектора к мишени 2,5:1. Специфический лизис измеряли через 16 час инкубации с использованием нерадиоактивного анализа цитотоксичности Cyttox 96 (Promega). Как показано на фиг. 9B, Т-клетки, трансдуцированные с использованием как CAR, так и abTCR-6MD, несущих связывающую группу против AFP158/HLA-A*02:01, были направлены на уничтожение положительных по антигену линий клеток HepG2 и SK-HEP-1-AFP-MG, но не приводили к уничтожению отрицательной по антигену линии клеток SK-HEP-1. Уровень специфического лизиса, наблюдаемый в трансдуцированных abTCR клетках, является эквивалентным уровню для CAR-Т-клеток.

Трансдуцированные Т-клетки с abTCR подвергаются дегрануляции после стимуляции антигеном

[0485] Для дополнительной характеристики видов биологической активности в Т-клетках, трансдуцированных abTCR, по сравнению с CAR, авторы настоящего изобретения использовали анализ проточной цитометрии для детекции поверхностной экспрессии CD107a в качестве показателя активности дегрануляции. Трансдуцированные abTCR и Т-клетки с CAR со связывающей группой против AFP158/HLA*02:01 получали, как выше, и инкубировали совместно с клетками HepG2, SK-HEP-1 и SK-HEP-1-AFP-MG в течение 4 часов в присутствии разведения 1:200 антитела против CD107a и коктейля ингибиторов транспорта белков (eBioscience). После совместной инкубации с клетками-мишенями, трансдуцированные Т-клетки окрашивали с использованием тетрамеров AFP158/HLA и антител против CD8. Дегрануляция в положительных по тетрамеру, положительных по CD8 Т-клетках показана на ФИГ. 10, правая панель. Наивысший уровень дегрануляции, как измерено по экспрессии CD107a, наблюдали после совместной инкубации с SK-HEP-1-AFP-MG (сплошная линия, серая заливка), за которым следовали HepG2 (пунктирная линия, серая заливка), в то время как дегрануляции не наблюдали для исходных отрицательных по антигену SK-HEP-1 (сплошная линия, белая заливка) с использованием трансдуцированных как abTCR, так и CAR, Т-клеток. Уровень дегрануляции являлся сходным между трансдуцированными abTCR и CAR клетками, при использовании одинаковых клеток-мишеней. Это согласовывалось с данными по опосредованному Т-клетками лизису клеток выше. Совместно, авторы настоящего изобретения показали, что трансдуцированные Т-клетки с abTCR способны отвечать эквивалентно трансдуцированным CAR клеткам на положительные по антигену злокачественные клетки, в отношении дегрануляции (ФИГ. 10) и опосредования уничтожения клеток (ФИГ. 9).

Продукция и секреция цитокинов Т-клетками с abTCR и CAR при уничтожении клеток опухолей

[0486] Получали Т-клетки, трансдуцированные с использованием либо abTCR, либо CAR, и обладающие сходной частотой трансдукции, и инкубировали совместно с клетками-мишенями, как выше. Высвобождение IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN- γ и TNF- α в среду после анализа уничтожения *in vitro*, показанного на фиг. 9B, измеряли с использованием мультиплексной системы Magpix (Luminex) с 8-плексным анализом цитокинов человека Bio-plex Pro (BioRad). Для достижения пределов детекции для анализа супернатантов, реакционные смеси для мишени SK-HEP-1-AFP-MG разводили в 25 раз, в то время как все другие образцы не разводили. Концентрации цитокинов определяли с использованием известной стандартной кривой, после вычитания высвобождения цитокинов из среды, только для мишени и только для эффектора.

[0487] Авторы настоящего изобретения оценили, что количество комплексов AFP158/

HLA-A*02:01 на поверхности HepG2 составляет ~100 на клетку, с использованием микроскопии высокого разрешения (данные не представлены). При таком низком количестве копий комплекса пептид/HLA, проточная цитометрия с использованием антитела против AFP158/HLA-A*02:01 являлась неспособной детектировать

5 значительный сдвиг MFI. В отличие от этого, экспрессия минигена AFP в клетках SK-HEP-1-AFP-MG приводила к сдвигу MFI в 10 раз по проточной цитометрии, показывая, что уровень комплекса AFP158/HLA-A*02:01 на клетках SK-HEP-1-AFP-MG являлся

10 значительно более высоким, чем в HepG2. Когда HepG2 использовали в качестве клеточных мишеней, и панель из восьми цитокинов человека (IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN- γ TNF- α) измеряли через 16 часов совместной инкубации с Т-клетками,

15 трансдуцированными abTCR или CAR, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α поддавались детекции в среде (ФИГ. 11A). Высвобождение цитокинов постоянно являлось более низким в образцах после трансдукции abTCR по сравнению с образцами после трансдукции CAR. Когда такой же анализ проводили с использованием SK-HEP-1-AFP-

20 MG, секрецию 7 из 8 цитокинов, протестированных авторами настоящего изобретения, детектировали после совместной инкубации с первичными Т-клетками, трансдуцированными с использованием либо abTCR, либо CAR (ФИГ. 11B). В случае каждого протестированного цитокина, уровень цитокина, детектированный в среде, являлся

либо сходным, либо более низким в образцах, содержащих трансдуцированные Т-клетки с abTCR, по сравнению с образцами с CAR-Т, для некоторых более, чем в два раза (например, IL-2, IFN- γ , TNF- α). Для клеток SK-HEP-1 отдельно также показан

25 поддающийся детекции уровень (~3000 пг/мл выше фона) IL-6 и IL-8 в отсутствие Т-клеток.

[0488] Для определения вклада трансдуцированных Т-клеток в качестве источника цитокинов, детектированных в среде, трансдуцированные abTCR и CAR Т-клетки со

30 сходной эффективностью трансдукции (34%) культивировали совместно с клетками-мишенями в соотношении 2,5:1 с коктейлем ингибиторов транспорта белков (eBioscience Cat#00498003) для предотвращения секреции цитокинов. После 4 часов обработки, Т-клетки окрашивали с использованием против тетрамера AFP158/HLA-A*02:01 и антитела

35 против CD4 вместе с антителами против TNF- α , против IFN- γ , против IL-2 или против IL-6. С использованием проточной цитометрии с отбором по тетрамеру AFP158+ клеткам (ФИГ. 12A-12H), авторы настоящего изобретения показали, что внутриклеточные TNF- α , IFN- γ и IL-2, но не IL-6, экспрессировались в Т-клетках, трансдуцированных как abTCR, так и CAR, когда их культивировали совместно с положительными по антигену

40 клетками-мишенями. Для каждого проверенного цитокина, уровень внутриклеточного цитокина постоянно являлся более высоким в SK-HEP-1-AFP-MG, чем в HepG2, что коррелирует с уровнем экспрессии антигена на клетках-мишенях. Для каждой популяции клеток-мишеней, не присутствовало значимых различий внутриклеточных цитокинов между клетками, трансдуцированными abTCR по сравнению с CAR, для каждого

45 протестированного цитокина. Это позволяет предполагать, что различие, наблюдаемое в анализе высвобождения цитокинов, может быть обусловлено механизмом обратной связи цитокинов. Отсутствие внутриклеточного IL-6 в трансдуцированных Т-клетках позволяет предполагать, что источник IL-6, детектированного в среде на фиг. 11B, происходит из клеток SK-HEP-1, а не из Т-клеток.

[0489] Для определения того, может ли активация abTCR в CD4+ Т-клетках приводить к специфическим биологическим ответам, авторы настоящего изобретения исследовали

внутриклеточную экспрессию цитокинов в CD4+ Т-клетках, экспрессирующих abTCR против AFP158, после стимуляции с использованием линий злокачественных клеток,

экспрессирующих AFP. CD3⁺ Т-клетки трансдуцировали с использованием abTCR против AFP158, как описано выше, и инкубировали с линией злокачественных клеток SK-HEP1-MG (AFP⁺), SK-HEP1 (AFP⁻), или HEPG2 (AFP⁺) в течение 4 часов в присутствии ингибиторов транспортеров белков. В качестве отрицательного контроля, трансдуцированные Т-клетки с abTCR инкубировали в отсутствие какой-либо линии злокачественных клеток. После инкубации, Т-клетки окрашивали с использованием антител против IFN γ , против IL2 или против TNF α , и совместно окрашивали с использованием AFP-тетрамера-PE и антитела против CD4. Клетки, отобранные по экспрессии abTCR, анализировали посредством проточной цитометрии по грануляции и экспрессии цитокинов (ФИГ. 13, Y-ось представляет собой угловое рассеяние, X-ось представляет собой окрашивание цитокинов). Экспрессия IFN γ , IL2 и TNF α являлась индуцированной после инкубации Т-клеток, трансдуцированных abTCR против AFP158, с AFP⁺ линиями злокачественных клеток SK-HEP1-MG и HEPG2, но не при инкубации с AFP⁻ линией клеток SK-HEP1 или в отсутствие какой-либо линии злокачественных клеток, показывая антигенспецифическую активацию abTCR в CD4⁺ Т-клетках.

Экспрессия маркеров истощения Т-клеток в Т-клетках с abTCR и CAR после совместного культивирования с клетками-мишенями

[0490] Для проверки уровня маркеров истощения, экспрессированных на трансдуцированных abTCR и CAR клетках после стимуляции антигеном, CD3⁺ Т-клетки получали из обогащенной по РВМС цельной крови с использованием набора для выделения Т-клеток человека EasySep (StemCell Technologies) и активировали с использованием CD3/CD28 Dynabeads, как выше. Активированная и подвергнутая размножению популяция клеток составляла >99% CD3⁺ по проточной цитометрии. Эти клетки затем трансдуцировали лентивирусными векторами, кодирующими CAR, содержащий scFv против AFP158/HLA-A*02:01 (SEQ ID NO: 37) или abTCR-6MD, содержащий такие же вариабельные домены против AFP158/HLA-A*02:01 (SEQ ID NO: 35 и 36) в течение 7-9 суток. Трансдуцированные клетки совместно культивировали с клетками-мишени в течение 16 часов при соотношении эффектора к мишени 2,5:1 и совместно окрашивали с использованием тетрамера AFP158 и антитела против CD8, вместе с антителами против маркеров истощения PD-1, TIM-3 или LAG-3. Уровень маркеров истощения на трансдуцированных Т-клетках анализировали посредством проточной цитометрии посредством отбора по тетрамер⁺ (т.е., трансдуцированных) Т-клеткам. В независимом эксперименте проточной цитометрии, авторы настоящего изобретения определили, что тетрамер⁺ Т-клетки, являвшиеся CD8⁻, являлись CD4⁺ (данные не представлены).

[0491] Повышающую регуляцию PD-1 наблюдали среди CD8⁻тетрамер⁺ Т-клеток, в то время как повышающую регуляцию LAG-1 и TIM-3 наблюдали среди CD8⁺тетрамер⁺ Т-клеток, после воздействия клеток-мишеней, экспрессирующих AFP (HepG2 и SK-HEP1-AFP-MG) (ФИГ. 14). Во всех случаях, уровни повышающей регуляции маркера истощения, наблюдаемые на трансдуцированных CAR Т-клетках, были эквивалентными или более высокими, чем уровни, наблюдаемые на трансдуцированных abTCR Т-клетках. Это позволяет предполагать, что трансдуцированные Т-клетки с abTCR могут вызывать более низкий уровень истощения Т-клеток, приводящий к более длительной персистенции Т-клеток *in vivo*. Процент клеток, положительных по каждому из маркеров истощения в тестируемых условиях, определен и показан в таблице 2.

Таблица 2

Линии клеточ-мишеней	Подгруппа Т-клеток	PD1 (%)		TIM3 (%)		LAG3 (%)	
		CAR	abTCR	CAR	abTCR	CAR	abTCR
HEPG2	CD8	11	5,0	33	15	21	7,7
	CD4	41	22	22	6,8	2,0	0,8
SK-HEP1	CD8	3,2	2,0	7,3	2,2	4,9	2,8
	CD4	27	14	8,1	2,0	1,0	0,5
SK-HEP1-AFP МГ	CD8	42	35	45	34	88	81
	CD4	87	81	46	34	32	24
Только Т-клетки	CD8	1,7	1,1	1,1	0,5	1,4	1,0
	CD4	15	7,4	2,2	0,4	0,4	0,2

Экспрессия маркеров дифференцировки Т-клеток на Т-клетках с abTCR и CAR

[0492] Для определения того, могут ли abTCR против AFP158 задерживать дифференцировку Т-клеток в ходе размножения *in vitro*, авторы настоящего изобретения измеряли экспрессию на клеточной поверхности трех маркеров дифференцировки Т-клеток, маркеров Т-клеток памяти CCR7 и CD28, и маркера терминальной дифференцировки гранзима В. Т-клетки трансдуцировали лентивирусными векторами, кодирующими CAR, содержащий scFv против AFP158/HLA-A*02:01 (SEQ ID NO: 37) или abTCR-6MD, содержащий такие же переменные домены против AFP158/HLA-A*02:01 (SEQ ID NO: 35 и 36), окрашивали с использованием антител против этих маркеров и анализировали посредством проточной цитометрии на сутки 10-12 после вирусной трансдукции (ФИГ. 15). Результаты показывают, что как для CD4⁺, так и для CD8⁺ Т-клеток, Т-клетки с abTCR экспрессировали больше CCR7 и CD28, но меньше гранзима В, чем Т-клетки с CAR, что позволяет предполагать, что Т-клетки с abTCR против AFP158 являлись менее дифференцированными, чем Т-клетки с CAR против AFP158, после размножения Т-клеток *in vitro*.

Сравнение конструкций abTCR-6MD и abTCR-7 против AFP

[0493] Рост клеток для первичных Т-клеток, трансдуцированных для экспрессии abTCR-6MD против AFP158/HLA-A*02:01, сравнивали с ростом Т-клеток, трансдуцированных с использованием abTCR-7 против AFP158/HLA-A*02:01, обладающего такими же переменными доменами антитела. $6,7 \times 10^5$ Т-клеток активировали посредством бусин с α CD3/ α CD28 (соотношение 1:1) в присутствии 100 ед./мл IL-2 на сутки 0. Активированные Т-клетки трансдуцировали либо лентивирусным вектором, кодирующим abTCR-6MD против AFP158/HLA-A*02:01 (химерная субъединица TCR δ , обладающая аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 35, и химерная субъединица TCR γ , обладающая аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 36), либо лентивирусным вектором, кодирующим abTCR-7 против AFP158/HLA-A*02:01 (химерная субъединица TCR δ , обладающая аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 81 и химерная субъединица TCR γ , обладающая аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 82), при MOI 4 на сутки 1. Трансдуцированные Т-клетки затем культивировали и подвергали размножению в присутствии IL-2 в течение 9-10 суток. Количество клеток подсчитывали на сутки 1, сутки 5, сутки 7 и сутки 9. Как показано на фиг. 16А, трансдуцированные abTCR-6-MD Т-клетки росли быстрее, чем трансдуцированные abTCR-7 Т-клетки, с почти вдвое большим количеством жизнеспособных клеток на сутки 9. Экспрессию конструкций abTCR-6MD и abTCR-7 в трансдуцированных Т-клетках на сутки 9 оценивали анализом Вестерн-блоттинга по меченым FLAG конструкциям. Кратко, 5 миллионов трансдуцированных Т-клеток лизировали в 100 мкл буфера для лизиса, и 13 мкл лизата разделяли в 4-12% полиакриламидном геле с использованием системы NuPage. Антитело мыши против

FLAG (1 мкг/мл) использовали для детекции цепей гамма abTCR, и антитело мыши против CD3-зета (1 мкг/мл) использовали для детекции эндогенного CD3. Как показано на фиг. 16В, конструкция abTCR-7 экспрессировалась на более высоких уровнях, чем конструкция abTCR-6MD. Интенсивность полос антител против FLAG для лизатов, нормализованную на соответствующие полосы антител против CD3 ζ , оценивали количественно с использованием программного обеспечения ImageJ и показали относительное увеличение на 20% для экспрессии abTCR-7 по сравнению с abTCR-6MD.

[0494] Активность уничтожения клеток-мишеней для Т-клеток с abTCR-6MD против AFP158/HLA-A*02:01 сравнивали с активностью для Т-клеток с abTCR-7 против AFP158/HLA-A*02:01. Первичные Т-клетки подвергали ложной трансдукции или трансдуцировали с использованием лентивирусных векторов, кодирующих конструкции либо abTCR-6MD против AFP158/HLA-A*02:01, либо abTCR-7 против AFP158/HLA-A*02:01, описанные выше. Т-клетки, трансдуцированные с использованием abTCR-6MD или abTCR-7, тестировали по их способности уничтожать клетки SK-HEP-1 (AFP-/HLA-A2+) и SK-HEP-1-AFP-MG (SK-HEP-1, трансдуцированные с использованием минигена AFP) при соотношении эффектора к мишени 5:1. Уровень специфического уничтожения измеряли через 16 часов, как описано выше. Как показано на фиг. 16С, конструкция abTCR-6MD со связывающей группой против AFP158/HLA-A*02:01 направляла сходный специфический лизис положительных по AFP клеток SK-HEP-1-AFP-MG по сравнению с abTCR-7 с такими же вариabельными доменами антитела.

Пример 5. Характеризация видов биологической активности Т-клеток, трансдуцированных с использованием конструкций abTCR-6MD и CAR, обладающих одинаковыми вариabельными доменами против CD19 человека

[0495] В примере 4, используемая группа антитела являлась миметиком TCR, который связывается с комплексом пептид/МНС в качестве антигена. Чтобы показать, что виды дизайна abTCR работают также с традиционными мишенями антител (антигенами клеточной поверхности), сходную группу экспериментов проводили с использованием конструкций на основе антитела против CD19 человека.

Т-клетки, трансдуцированные abTCR против CD19, могут уничтожать положительные по CD19 злокачественные клетки

[0496] Первичные Т-клетки подвергали ложной трансдукции или трансдуцировали с использованием лентивирусных векторов, кодирующих CAR, содержащий связывающий домен против CD19 (SEQ ID NO: 44, содержащий scFv с доменом IgV_H, SEQ ID NO: 45, и домен VL Ig, SEQ ID NO: 46, из иллюстративного антитела против CD19) или abTCR-6MD, содержащий такие же вариabельные домены против CD19 (SEQ ID NO: 42 и 43). Т-клетки, трансдуцированные CAR или abTCR (оба с частотой трансдукции 25%) использовали для тестирования их способности уничтожать линии В-клеток JeKo-1 (CD19⁺), IM9 (CD19⁺), Jurkat (CD19⁻), и THP-1 (CD19⁻), при соотношении эффектора к мишени 5:1. Уровень специфического уничтожения измеряли через 16 часов с использованием такого же способа, как описано для FIG 9В. Как показано на фиг. 17, как CAR, так и abTCR-6MD, со связывающей группой против CD19, направляли уничтожение положительных по CD19 клеток JeKo-1 и IM9 на сходных уровнях, но не уничтожали Jurkat и THP-1, которые являются отрицательными по CD19.

Секреция цитокинов Т-клетками с abTCR и CAR при уничтожении клеток опухолей

[0497] Такие же популяции трансдуцированных Т-клеток, какие использовали в эксперименте по уничтожению злокачественных опухолей, использовали в анализе высвобождения цитокинов посредством их совместной инкубации с JeKo-1, IM9, THP-1 и Jurkat в качестве клеток-мишеней. Панель из восьми цитокинов человека (IL-2, IL-4,

IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α) измеряли через 16 часов. Все тестируемые цитокины детектировали в среде от трансдуцированных CAR T-клеток после совместной инкубации с CD19⁺ клетками-мишенями, но не с CD19⁻ клетками (ФИГ. 18А и 18В). В образцах после совместной инкубации с трансдуцированными abTCR T-клетками, высвобождение всех тестируемых цитокинов, за исключением IL-10, являлось более низким в образцах abTCR с CD19⁺ клетками. Эти обнаружения с использованием конструкций антитела против CD19 являлись сходными с обнаружениями с использованием конструкций антитела против AFP158/HLA-A*02:01: в то время как сходное уничтожение злокачественных клеток наблюдали для трансдуцированных CAR-T и abTCR клеток, уровень высвобождения цитокинов являлся более низким при использовании трансдуцированных abTCR T-клеток. Это может обеспечивать преимущество для использования abTCR в условиях, когда высокие уровни высвобождения цитокинов вызывают нежелательные физиологические эффекты.

[0498] Для определения того, может ли активация abTCR в CD4⁺ T-клетках приводить к специфическим биологическим ответам, авторы настоящего изобретения исследовали внутриклеточную экспрессию цитокинов в CD4⁺ T-клетках, экспрессирующих abTCR против CD19, после стимуляции с использованием линий злокачественных клеток, экспрессирующих CD19. CD3⁺ T-клетки трансдуцировали с использованием клона 5-13 abTCR-6MD (abTCR-6MD, обладающего связывающей группой против CD19 клона 5-13, содержащей аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 56 и 54) и инкубировали с линией злокачественных клеток Raji (CD19⁺), Raji-CD19KO (CD19⁻) или Jeko-1 (CD19⁺) в течение 4 часов в присутствии ингибиторов транспортеров белков. В качестве отрицательного контроля, трансдуцированные T-клетки с abTCR инкубировали в отсутствие какой-либо линии злокачественных клеток. После инкубации, T-клетки окрашивали с использованием антител против IFN γ , против IL2 или против TNF α , и совместно окрашивали с использованием антитела против Fab человека (CD19) и антитела против CD4. Клетки, отобранные по экспрессии abTCR, анализировали посредством проточной цитометрии по грануляции и экспрессии цитокинов (ФИГ. 19, Y- ось представляет собой угловое рассеяние, X- ось представляет собой окрашивание цитокинов). Экспрессия IFN γ , IL2 и TNF α являлась индуцированной после инкубации T-клеток, трансдуцированных abTCR против CD19, с CD19⁺ линиями злокачественных клеток Raji и Jeko-1, но не при инкубации с CD19⁻ линией клеток Raji-CD19KO или в отсутствие какой-либо линии злокачественных клеток, показывая антигенспецифическую активацию abTCR в CD4⁺ T-клетках.

Экспрессия маркеров истощения T-клеток в T-клетках с abTCR и CAR после совместного культивирования с клетками-мишенями

[0499] Уровень маркеров истощения, экспрессируемых на клетках, трансдуцированных abTCR и CAR против CD19, после стимуляции антигеном определяли, как описано выше для химерных рецепторов против AFP158. Клетки трансдуцировали с использованием клона 5-13 abTCR-6MD или CAR, содержащих одинаковые переменные домены против CD19. Линии клеток-мишеней включали Raji (CD19⁺), Raji-CD19KO (CD19⁻) и Jeko-1 (CD19⁺). Процент клеток, положительных по каждому из маркеров истощения в тестируемых условиях, определен и показан в таблице 3.

Таблица 3

Линии клеток-мишеней	Подгруппа T-клеток	PD1 (%)	TIM3 (%)	LAG3 (%)
----------------------	--------------------	---------	----------	----------

		CAR	abTCR	CAR	abTCR	CAR	abTCR
Raji	CD8	14	4,0	47	37	95	93
	CD4	74	41	29	24	65	47
Raji-CD19 KO	CD8	2,9	0,3	54	35	40	29
	CD4	27	7,0	12	13	5,3	4,1
Jeko-1	CD8	14	4,7	48	40	92	76
	CD4	70	33	36	30	58	31
Только Т-клетки	CD8	1,7	0,2	5,1	9,8	9,4	5,6
	CD4	15	2,2	0,3	1,0	1,1	1,0

Экспрессия маркеров дифференцировки Т-клеток на Т-клетках с abTCR и CAR

[0500] Для определения того, могут ли abTCR против CD19 задерживать дифференцировку Т-клеток в ходе размножения *in vitro*, авторы настоящего изобретения измеряли экспрессию на клеточной поверхности трех маркеров дифференцировки Т-клеток, маркеров Т-клеток памяти CCR7 и CD28, и маркера терминальной дифференцировки гранзима В. Т-клетки трансдуцировали с использованием клона 5-13 abTCR-6MD или CAR, обладающих одинаковыми варибельными доменами против CD19, окрашивали с использованием антител против этих маркеров, и анализировали посредством проточной цитометрии на сутки 10-12 после вирусной трансдукции (ФИГ. 20). Результаты показывают, что как для CD4⁺, так и для CD8⁺ Т-клеток, Т-клетки с abTCR экспрессировали больше CCR7 и CD28, но меньше гранзима В, чем Т-клетки с CAR, что позволяет предполагать, что Т-клетки с abTCR клона 5-13 являлись менее дифференцированными, чем соответствующие Т-клетки с CAR, после размножения Т-клеток *in vitro*, что согласуется с тем, что наблюдали для химерных рецепторов против AFP158.

Пролиферация Т-клеток с abTCR и CAR

[0501] Для дополнительного определения того, являются ли Т-клетки с abTCR менее дифференцированными и обладают ли более высоким пролиферативным потенциалом, чем Т-клетки с CAR, авторы настоящего изобретения мониторировали изменение флуоресценции CFSE, показателя деления клеток, для Т-клеток с abTCR и CAR после их привлечения положительными по антигену злокачественными клетками. Т-клетки метили красителем CFSE на сутки 10 после вирусной трансдукции с использованием клона 5-13 abTCR-6MD или CAR, обладающих одинаковыми варибельными доменами против CD19, и фоновую флуоресценцию регистрировали посредством проточной цитометрии. Меченые Т-клетки инкубировали с клетками Raji (CD19+ линия злокачественных клеток) в не содержащей цитокинов среде. Флуоресценцию CFSE измеряли посредством проточной цитометрии на сутки 2 и сутки 3 для CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток (ФИГ. 21). Уменьшение интенсивности флуоресценции CFSE между сутками 2 и сутками 3, указывающее на уровень пролиферации клеток, являлось значительно более высоким в Т-клетках с abTCR, чем в Т-клетках с CAR, показывая, что Т-клетки с abTCR клона 5-13 подвергаются большему количеству делений клеток, чем соответствующие Т-клетки с CAR.

Интернализация химерного рецептора в Т-клетках с abTCR и CAR

[0502] Для сравнения скорости интернализации abTCR и CAR на поверхности Т-клеток, Т-клетки трансдуцировали с использованием клона 5-13 abTCR-6MD или CAR, содержащих одинаковые варибельные домены против CD19, и окрашивали на льду в течение 30 минут с использованием антиидиотипического антитела, узнающего связывающую группу против CD19, меченного Cy5Her5E, чувствительным к pH красителем, излучающим флуоресценцию при кислом pH 6,5. Затем клетки инкубировали при 37°C в течение указанного количества времени, фиксировали и анализировали

посредством проточной цитометрии по грануляции и экспрессии химерного рецептора (ФИГ. 22, Y-ось представляет собой угловое рассеяние, X-ось представляет собой окрашивание CyрHer5E). Результаты показывают, что почти все CAR были интернализированы через 90 минут после окрашивания. В отличие от этого, abTCR были интернализированы с намного меньшей скоростью, и большинство из abTCR оставались на клеточной поверхности даже через 90 минут.

Сравнение конструкций abTCR и cTCR против CD19

[0503] Рост клеток для первичных Т-клеток, трансдуцированных для экспрессии abTCR-6MD против CD19, сравнивали с ростом Т-клеток, трансдуцированных с использованием химерной конструкции (cTCR) против CD19, обладающей такими же вариабельными доменами и трансмембранными доменами антитела, но с константными областями из полипептидов TCR δ и TCR γ . $6,7 \times 10^5$ Т-клеток активировали посредством бусин с α CD3/ α CD28 (соотношение 1:1) в присутствии 100 ед./мл ИЛ-2 на сутки 0.

Активированные Т-клетки трансдуцировали либо лентивирусным вектором, кодирующим abTCR-6MD против CD19 (химерная субъединица TCR δ , обладающая аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 56, и химерная субъединица TCR γ , обладающая аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 54), либо лентивирусным вектором, кодирующим cTCR против CD19 (химерная субъединица TCR δ , обладающая аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 75, и химерная субъединица TCR γ , обладающая аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 76), при MOI 4 на сутки 1. Трансдуцированные Т-клетки затем культивировали и подвергали размножению в присутствии ИЛ-2 в течение 9-10 суток. Количество клеток подсчитывали на сутки 1, сутки 5, сутки 7 и сутки 9. Как показано на фиг. 23А, трансдуцированные abTCR Т-клетки росли быстрее, чем трансдуцированные cTCR Т-клетки, с количеством жизнеспособных клеток, большим более, чем в 1,7 раз, на сутки 9.

[0504] Активность уничтожения клеток-мишеней для Т-клеток с abTCR против CD19 сравнивали с активностью для Т-клеток с cTCR против CD19. Первичные Т-клетки подвергали ложной трансдукции или трансдуцировали с использованием лентивирусных векторов, кодирующих либо abTCR-6MD против CD19, либо cTCR против CD19. Т-клетки, трансдуцированные с использованием abTCR или cTCR, тестировали по их способности уничтожать положительную по CD19- линию клеток-мишеней Nalm-6 при соотношении эффектора к мишени 5:1. Уровень специфического уничтожения измеряли через 16 часов, как описано выше. Как показано на фиг. 23В, конструкция abTCR-6MD со связывающей группой против CD19 направляла больший специфический лизис положительных по CD19 клеток Nalm-6, чем cTCR с такими же вариабельными доменами против CD19.

Пример 6. Характеризация видов биологической активности Т-клеток, трансдуцированных с использованием конструкций abTCR-6MD и CAR, содержащих одинаковые вариабельные домены против NY-ESO-1/HLA-A*02:01

Т-клетки, трансдуцированные abTCR против NY-ESO-1/HLA-A*02:01, могут уничтожать положительные по NY-ESO-1 злокачественные клетки

[0505] Первичные Т-клетки подвергали ложной трансдукции или трансдуцировали для экспрессии либо CAR, либо abTCR-6MD, содержащих связывающую группу против NY-ESO-1/HLA-A*02:01, содержащую домен IgV_L, обладающий аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 73, и домен IgV_H, обладающий аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 72. CAR содержит scFv, обладающий, от N-конца

к С-концу, домен IgV_L, линкер (SEQ ID NO: 74) и домен IgV_H. Т-клетки, трансдуцированные с использованием CAR или abTCR, экспрессировали их соответствующие химерные рецепторы на сходных уровнях, как анализировано посредством проточной цитометрии, и их использовали для тестирования из способности

5 уничтожать линии клеток IM9 (HLA-A2⁺, NY-ESO-1⁺), Colo205 (HLA-A2⁺, NY-ESO-1⁻), MDA-231 (HLA-A2⁺, NY-ESO-1⁻), MCF7 (HLA-A2⁺, NY-ESO-1⁻), JeKo-1 (HLA-A2⁺, NY-ESO-1⁺), Raji (HLA-A2⁺, NY-ESO-1⁻), Hep1 (HLA-A2⁺, NY-ESO-1⁻), и Jurkat (HLA-A2⁺, NY-ESO-1⁻) при соотношении эффектора к мишени 5:1. Уровень специфического

10 уничтожения измеряли через 16 часов с использованием таких же способов, описанным выше. Как показано на фиг. 24, как CAR, так и abTCR-6MD со связывающей группой против NY-ESO-1/HLA-A*02:01, направляли уничтожение положительных по NY-ESO-1 клеток JeKo-1 и IM9 на сходных уровнях, но не уничтожали другие клетки, которые являются отрицательными по NY-ESO-1.

15 Секретия цитокинов Т-клетками с abTCR и CAR при уничтожении клеток опухолей [0506] Такие же популяции трансдуцированных Т-клеток, какие использовали в эксперименте по уничтожению злокачественных опухолей, использовали в анализе высвобождения цитокинов посредством их совместной инкубации с клетками IM9, Colo205, MDA-231, MCF7, JeKo-1, Hep1 и Jurkat. Панель из четырех цитокинов человека

20 (IL-2, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α) измеряли через 16 часов. Все тестированные цитокины детектировали в среде от трансдуцированных CAR и abTCR Т-клеток после совместной инкубации с NY-ESO-1⁺ клетками-мишенями, но не с большинством NY-ESO-1⁻ клеток (данные не представлены). Важно, что уровни цитокинов, высвобождаемых из

25 большинства тестированных NY-ESO-1⁺ клеток-мишеней посредством совместной инкубации с трансдуцированными abTCR Т-клетками, являлись значительно более низкими, чем для совместной инкубации с трансдуцированными CAR Т-клетка (данные не представлены).

30 Пример 7. Характеризация видов биологической активности Т-клеток - естественных киллеров Т (NKT) и регуляторных Т-клеток (Т-рег), трансдуцированных с использованием конструкций abTCR-6MD

Клетки NKT, трансдуцированные abTCR против CD19

[0507] Клетки NKT выделяли из PBMC человека посредством непрямого магнитного

35 мечения не относящихся к CD3⁺/CD56⁺ клеток (не относящихся к NKT клеток) с использованием коктейля биотина-антител и микробусин против биотина, и истощения не относящихся к NKT клеток для обогащения CD3⁺/CD56⁺ клеток NKT. Поверхностную экспрессию CD3 и CD56 для обогащенной популяции клеток NKT- оценивали посредством проточной цитометрии, и она показана на фиг. 25А. Клетки NKT

40 активировали посредством бусин анти-CD3/анти-CD28, трансдуцировали лентивирусом, кодирующим abTCR против CD19, и подвергали размножению в RPMI-1640, содержащей 10% FBS и IL-2 (100 ед./мл). Эффективность трансдукции составляла более 80%, как измерено посредством проточной цитометрии с использованием антиидиотипического антитела, специфического для связывающей группы против CD19. Клетки NKT совместно

45 инкубировали с экспрессирующей CD19 линией злокачественных клеток Raji или линией злокачественных клеток Raji с нокаутом CD19 (CD19ko) при соотношении эффектора к мишени 5:1 в течение 16 часов с последующим измерением высвобождения цитокинов (IL-2, GM-CSF, IFN γ , TNF α) в среде (ФИГ. 25В). Клетки NKT, трансдуцированные abTCR

против CD19, но не подвергнутые ложной трансдукции клетки NKT, являлись активированными для высвобождения каждого из тестируемых цитокинов при инкубации с положительными по CD19 клетками Raji, но не с отрицательными по CD19 клетками Raji CD19ko, что указывает на то, что клетки NKT могут быть специфически активированы посредством связывания трансдуцированного абTCR с антигеном CD19 на злокачественных клетках.

Клетки Т-рег, трансдуцированные абTCR против CD19

[0508] Клетки Т-рег выделяли из РВМС человека посредством прямого магнитного

мечения клеток CD4⁺/CD25⁺ Т-рег. Поверхностную экспрессию CD4 и CD25 для выделенной популяции клеток Т-рег оценивали посредством проточной цитометрии, и она показана на фиг. 26А. Клетки Т-рег активировали посредством бусин анти-CD3/анти-CD28, трансдуцировали лентивирусом, кодирующим абTCR против CD19, и подвергали размножению в RPMI-1640, содержащей 10% FBS и IL-2 (100 ед./мл).

Эффективность трансдукции составляла 80%, как измерено посредством проточной цитометрии с использованием антиидиотипического антитела, специфического для связывающей группы против CD19. Клетки Т-рег совместно инкубировали с экспрессирующей CD19 линией злокачественных клеток Raji или линией злокачественных клеток Raji с нокаутом CD19 (CD19ko) при соотношении эффектора к мишени 5:1 в течение 16 часов с последующим измерением высвобождения цитокина IL-10 в среде (ФИГ. 26В). Клетки Т-рег, трансдуцированные абTCR против CD19, но не подвергнутые ложной трансдукции клетки Т-рег, являлись активированными для высвобождения IL-10 при инкубации с положительными по CD19 клетками Raji, но не с отрицательными по CD19 клетками Raji CD19ko, что указывает на то, что клетки Т-рег могут быть специфически активированы посредством связывания трансдуцированного абTCR с антигеном CD19 на злокачественных клетках.

Пример 8. Характеризация видов биологической активности Т-клеток, трансдуцированных абTCR, обладающими различными константными доменами тяжелой цепи антитела

[0509] В предшествующих примерах, группы антител, использованные в конструкциях абTCR, содержали домен CH1 IgG1, обладающий аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 39. Чтобы показать, что виды дизайна абTCR работают также с доменами CH1 из тяжелых цепей других иммуноглобулинов, анализы уничтожения клеток-мишеней проводили, как описано выше, с использованием конструкций на основе антитела против AFP158/HLA-A*02:01, обладающего доменами домен CH1 из IgG1 (SEQ ID NO: 39), IgG2 (SEQ ID NO: 60, 61 или 62), IgG3 (SEQ ID NO: 63) или IgG4 (SEQ ID NO: 64). Т-клетки, трансдуцированные с использованием абTCR, оценивали по связыванию тетрамера AFP158 в качестве показателя поверхностной экспрессии (Таблица 4) и тестировали по их способности уничтожать клетки HepG2 (AFP+/HLA-A2+), SK-HEP-1 (AFP-/HLA-A2+) и SK-HEP-1-AFP-MG (SK-HEP-1, трансдуцированные с использованием минигена AFP). Специфический лизис измеряли через 16 час инкубации с использованием нерадиоактивного анализа цитотоксичности Cytox 96 (Promega). Как показано на фиг. 27, Т-клетки, трансдуцированные с использованием любого из абTCR, несущих связывающую группу против AFP158/HLA-A*02:01, были направлены на уничтожение положительных по антигену линий клеток HepG2 и SK-HEP-1-AFP-MG, но не приводили к уничтожению отрицательной по антигену линии клеток SK-HEP-1. Важно, что даже несмотря на то, что поверхностная экспрессия абTCR, содержащих не относящиеся к IgG1 домены CH1, являлась более низкой по сравнению с абTCR, содержащим CH1 IgG1 (см. таблицу 4), они приводили к сходным уровням уничтожения клеток-мишеней, что

позволяет предполагать, что они могут обладать улучшенными функциональными свойствами.

Таблица 4. Поверхностная экспрессия abTCR

abTCR	Тетрамер AFP158+ (процент)
Ложная трансдукция	0,3
IgG1	64,5
IgG2-0C	9,58
IgG2-1C	18,2
IgG2-2C	7,36
IgG3	13,6
IgG4	22,2

Пример 9. Характеризация видов биологической активности Т-клеток, трансдуцированных abTCR, содержащими костимулирующие домены

[0510] Чтобы показать осуществимость видов дизайна abTCR, включающих С-концевые костимулирующие домены, различные конструкции abTCR против AFP158/HLA-A*02:01 разработали с использованием костимулирующих фрагментов, происходящих из CD28 и/или 4-1BB (ФИГ. 28). abTCR состояли из химерной субъединицы TCR γ , содержащей аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 36, и химерной субъединицы TCR δ , содержащей аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 35. Субъединицы abTCR, обладающие костимулирующим доменом CD28, имели аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 70, слитую с их С-концами, и субъединицы, обладающие костимулирующим доменом 4-1BB, имели аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 71, слитую с их С-концами. Конструкциями abTCR трансдуцировали клетки J.RT3-R3.5, и экспрессию abTCR, и восстановление

поверхностной экспрессии CD3 анализировали, как описано выше, с использованием проточной цитометрии. Результаты обобщены в таблице 5. Экспрессия abTCR и их способность восстанавливать экспрессию CD3, являлись сходными среди различных конструкций abTCR с костимулирующими доменами и без. В другом эксперименте, первичные Т-клетки трансдуцировали с использованием конструкций abTCR и анализировали посредством проточной цитометрии по экспрессии CD8 и связыванию тетрамера AFP158 (Таблица 6). Первичные Т-клетки, трансдуцированные с использованием abTCR, отбирали по связыванию тетрамера AFP158 и экспрессии либо CD4, либо CD8, и анализировали посредством проточной цитометрии по экспрессии CCR7, CD45RA, CD28 и гранзима В (Таблица 7). Эти результаты показывают, что вирусная трансдукция и дифференцировка трансдуцированных Т-клеток являлись сходными среди различных конструкций abTCR с костимулирующими доменами и без. Анализы уничтожения клеток-мишеней проводили, как описано выше, с использованием конструкций abTCR. Т-клетки, трансдуцированные с использованием abTCR, оценивали по их способности уничтожать клетки HepG2 (AFP+/HLA-A2+), SK-HEP-1 (AFP-/HLA-A2+) и SK-HEP-1-AFP-MG (SK-HEP-1, трансдуцированные с использованием минигена AFP) клетки. Как показано на фиг. 29, Т-клетки, трансдуцированные с использованием любого из abTCR, были направлены на уничтожение положительных по антигену линий клеток HepG2 и SK-HEP-1-AFP-MG, но не приводили к уничтожению отрицательной по антигену линии клеток SK-HEP-1.

[0511] Для дальнейшей характеристики конструкций abTCR, содержащих костимулирующие домены, Т-клетки, трансдуцированные с использованием различных abTCR, отбирали по 4 различным популяциям (CD8+/abTCR+; CD8+/abTCR-; CD4+/abTCR+; CD4+/abTCR-) и анализировали посредством проточной цитометрии по

экспрессии маркеров истощения Т-клеток PD-1, TIM-3 и LAG-3 после инкубации с клетками HepG2, SK-HEP-1, и SK-HEP-1-AFP-MG. Для Т-клеток, с использованием различных abTCR, содержащих С-концевые костимулирующие домены, не показано значительного увеличения истощения Т-клеток после активации посредством положительных по мишени клеток HepG2 и SK-HEP-1-AFP-MG, по сравнению с Т-клетками, трансдуцированными с использованием abTCR, лишенного каких-либо костимулирующих доменов (данные не представлены). Т-клетки, трансдуцированные с использованием различных abTCR, использовали в анализе высвобождения цитокинов, как описано выше, посредством их совместной инкубации с клетками SK-HEP-1 и SK-HEP-1-AFP-MG. Панель из четырех цитокинов человека (IL-2, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α) измеряли через 16 часов. Все тестируемые цитокины детектировали в среде от трансдуцированных abTCR Т-клеток после совместной инкубации с AFP⁺ клетками SK-HEP-1-AFP-MG, но не с AFP⁻ клетками SK-HEP-1 (ФИГ. 30). Для Т-клеток, трансдуцированных с использованием различных abTCR, содержащих С-концевые костимулирующие домены, не показано значительного увеличения высвобождения цитокинов после активации посредством положительных по мишени клеток SK-HEP-1-AFP-MG, по сравнению с Т-клетками, трансдуцированными с использованием abTCR, лишенного каких-либо костимулирующих доменов, и в некоторых случаях показано уменьшение высвобождения цитокинов.

[0512] Эксперименты по уничтожению клеток-мишеней, истощению Т-клеток и высвобождению цитокинов повторяли с использованием конструкций abTCR против CD19, разработанных с использованием костимулирующих фрагментов, происходящих из CD28 и/или 4-1BB, как описано выше и изображено на фиг. 28. abTCR состояли из химерной субъединицы TCR γ , содержащей аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 54, и химерной субъединицы TCR δ , содержащей аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 56. Как и для конструкций abTCR против AFP158/HLA-A*02:01, поведение Т-клеток, трансдуцированных с использованием abTCR против CD19, содержащих костимулирующие домены, являлось сходным с поведением Т-клеток, трансдуцированных с использованием конструкции abTCR против CD19 без каких-либо костимулирующих доменов (ФИГ. 31 и 32).

Таблица 5. Поверхностная экспрессия abTCR и CD3

abTCR	abTCR ⁺ /CD3 ⁻ (процент)	abTCR ⁺ /CD3 ⁺ (процент)	abTCR ⁺ /CD3 ⁺ (процент)
Ложная трансдукция	0,02	2,49	0,03
abTCR-6M	1,11	0,217	93,8
abTCR-6M-1	1,11	0,217	93,8
abTCR-6M-2	1,31	0,259	93,5
abTCR-6M-3	2,8	0,418	83,5
abTCR-6M-4	4,43	0,682	77,6
abTCR-6M-5	3,51	0,685	81,3
abTCR-6M-6	2,91	0,738	77,3
abTCR-6M-7	2,8	1,17	66,4
abTCR-6M-8	3,68	0,892	75,5

Таблица 6. Поверхностная экспрессия CD8 и abTCR

abTCR	CD8 ⁺ /тетрамер ⁺	CD8 ⁺ /тетрамер ⁺
Ложная трансдукция	0,068	0,013
abTCR-6M	20,6	38,3
abTCR-6M-1	28,0	44,7

abTCR-6M-2	23,1	39,2
abTCR-6M-3	24,9	40,0
abTCR-6M-4	18,2	37,1
abTCR-6M-5	14,3	33,3
abTCR-6M-6	16,1	32,6
abTCR-6M-7	19,6	38,8
abTCR-6M-8	7,79	19,6

Таблица 7. Поверхностная экспрессия CCR7, CD45RA, CD28 и гранзима В на CD4+ и CD8+ Т-клетках с abTCR

abTCR	Процент экспрессии (отбор по CD4 ⁺ /тетрамер ⁺)			Процент экспрессии (отбор по CD8 ⁺ /тетрамер ⁺)		
	CD28	CCR7	Гранзим В	CD28	CCR7	Гранзим В
abTCR-6M	60	56	2,4	52	26,5	23,3
abTCR-6M-1	65,9	53,7	2,31	57,1	20,9	21,6
abTCR-6M-2	60,3	53,8	2,41	57,1	19,1	28,5
abTCR-6M-3	60,1	53,7	2,96	54,6	18,9	29,1
abTCR-6M-4	63	52,5	3,11	58,6	20,2	30,1
abTCR-6M-5	56,1	54	3,74	52,2	19,1	34,1
abTCR-6M-6	62,3	54,8	3,1	54,5	19	33,4
abTCR-6M-7	63	52,2	2,4	57,7	18,4	28,1
abTCR-6M-8	55,6	54,1	2,44	57,7	22,8	34,2

Пример 10. Исследования эффективности *in vivo* Т-клеток, трансдуцированных abTCR

Противоопухолевая активность *in vivo* для антитела против AFP158/HLA-A*02:01 в модели трансплантата печеночно-клеточной карциномы человека

[0513] Противоопухолевую активность *in vivo* Т-клеток, трансдуцированных конструкциями abTCR-6MD, содержащими связывающую группу против AFP158/HLA-A*02:01 (SEQ ID NO: 35 и 36), тестировали с использованием подкожной (s.c.) модели SK-HEP-1-AFP-MG на мышях SCID-beige. Клетки SK-HEP-1-AFP-MG s.c. имплантировали в правый бок мышей SCID-beige при 5×10^6 клеток на мыш. Когда средний объем опухоли достигал 100 мм^3 , животных на основании объема опухоли случайным образом распределяли на две группы (по 8 мышей на группу), которым вводили: (i) подвергнутые ложной трансдукции Т-клетки и (ii) Т-клетки, трансдуцированные abTCR. Животных обрабатывали немедленно после случайного распределения посредством инъекции 10^7 подвергнутых ложной трансдукции или трансдуцированных abTCR клеток на мыш, внутривенно (i.v.) один раз в каждые две недели, в течение трех дозирования. У мышей тщательно мониторировали общее состояние здоровья, возможный неблагоприятный ответ, при его наличии, и изменения объема опухолей. Как подвергнутые ложной трансдукции, так и трансдуцированные abTCR Т-клетки являлись хорошо переносимыми при настоящих дозировке и расписании. Зависимых от дозы изменений массы тела не наблюдали на протяжении исследования (ФИГ. 33). В то время как опухоли SK-HEP-1-AFP-MG продолжали расти после i.v. введения подвергнутых ложной трансдукции или трансдуцированных abTCR Т-клеток, скорость роста опухолей после обработки трансдуцированными abTCR Т-клетками, была медленнее по сравнению с опухолями после обработки подвергнутыми ложной трансдукции Т-клетками. Как показано на фиг. 34А, расхождение кривых роста опухолей началось через 20 суток после начала дозирования. На сутки 31, наблюдали 23% ингибирование роста опухолей после обработки трансдуцированными abTCR Т-клетками (t-критерий, $p=0,018$).

[0514] Противоопухолевую активность трансдуцированных abTCR Т-клеток далее

оценивали на более крупных с.с. опухолях SK-HEP-1-AFP-MG. В исследовании с использованием мышей, несущих опухоль SK-HEP-1-AFP-MG, животных случайным образом распределяли на две группы, когда средний объем опухоли достигал 300 мм³ (n=4 мыши на группу). Животных либо не подвергали обработке, либо подвергали

5 однократной внутриопухолевой (i.t.) инъекции 10⁷ трансдуцированных abTCR Т-клеток на мышь. Как показано на фиг. 34В, i.t. доставка трансдуцированных abTCR Т-клеток замедляла рост крупных опухолей SK-HEP-1-AFP-MG, как измерено по изменению объема опухолей в зависимости от времени. Сравнение площадей под кривыми между

10 крупными опухолями SK-HEP-1-AFP-MG без обработки и после обработки трансдуцированными abTCR Т-клетками показало статистически значимое различие между двумя группами (двусторонний t-критерий, p=0,04). Совместно, как i.v., так и i.t. введение трансдуцированных abTCR Т-клеток значимо ингибировало рост прижившихся с.с. ксенотрансплантатов SK-HEP-1-AFP-MG.

15 Противоопухолевая активность *in vivo* для антитела против CD19 в модели ксенотрансплантата лимфомы

[0515] Противоопухолевую активность *in vivo* Т-клеток, трансдуцированных с использованием CAR и abTCR с иллюстративной связывающей группой антитела против hCD19, тестируют в модели ксенотрансплантата положительной по CD19 лимфомы

20 человека на мышах NOD SCID gamma (NSG). Клетки Raji-luc-GFP закупают из Comparative Biosciences, Inc. (Sunnyville, California 94085) и культивируют в среде RPMI+10% FBS и 1% L-глутамином при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. Клетки Raji-luc-GFP получены из положительной по CD19 линии клеток лимфомы Беркитта, Raji, после стабильной трансфекции двумя репортерными генами, кодирующими как люциферазу

25 светляка (luc), так и зеленый флуоресцентный белок, с получением в результате клеток, которые можно отслеживать *in vivo* с использованием билюминесцентной визуализации. Мышей NSG закупают из Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME USA 04609) и акклиматизируют в течение по меньшей мере 7 суток до эксперимента. Клетки Raji-luc-GFP ресуспендируют в PBS и имплантируют внутривенно (i.v.) мышам NSG через

30 хвостовую вену при 1×10⁶ клеток/100 мкл/мышь. Через пять суток после имплантации опухоли, животных подвергают визуализации с использованием системы визуализации Xenogen IVIS для оценки опухолевой нагрузки. Мышей случайным образом распределяют, на основании испускания фотонов, на следующие четыре группы со

35 средним испусканием фотонов 6,7×10⁵ фотонов (n=6 мышей на группу): (i) без обработки, (ii) с обработкой подвергнутыми ложной трансдукции Т-клетками человека, (iii) с обработкой CAR-Т против CD19 и (iv) с обработкой Т-клетками с abTCR против hCD19. Животных обрабатывают i.v. подвергнутыми ложной трансдукции Т-клетками или Т-клетками с CAR против CD19 немедленно после случайного распределения в дозе 10⁷

40 клеток на мышь, один раз в каждые две недели, в течение 3 дозирования.

[0516] Животных тщательно мониторируют после дозирования. Билюминесцентную визуализацию с использованием системы Xenogen IVIS проводят один раз в неделю в течение вплоть до 8 недель.

[0517] Исследования на животных проводили, как описано выше, для оценки

45 противоопухолевой активности *in vivo* Т-клеток, трансдуцированных с использованием abTCR-6MD, обладающих связывающими группами против CD19.

[0518] Самок мышей NSG в возрасте 6-8 недель использовали в этом исследовании. Линию клеток Raji-luc-GFP культивировали в среде RPMI+10% FBS и 1% L-глутамин при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. Клетки Raji-luc-GFP ресуспендировали

в PBS и имплантировали *i.v.* мышам 40 NSG при 1×10^6 клеток/100мкл/мышь.

[0519] Через четверо суток после имплантации опухоли, мышей подвергали визуализации с использованием Ivis Spectrum для подтверждения роста опухолей. Мышей случайным образом распределяли, на основании испускания фотонов, на шесть групп для следующей обработки (n=6 мышей/группу): 1) Носитель (PBS); 2) Ложная (8×10^6 подвергнутых ложной трансдукции Т-клеток); 3) Клон 5 abTCR (8×10^6 Т-клеток, трансдуцированных с использованием abTCR-6MD, обладающего связывающей группой против CD19 клона 5, содержащей аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 42 и 54); 4) Клон 5-3 abTCR (8×10^6 Т-клеток, трансдуцированных с использованием abTCR-6MD, обладающего связывающей группой против CD19 клона 5-3, содержащей аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 42 и 43); 5) Клон 5-9 abTCR (8×10^6 Т-клеток, трансдуцированных с использованием abTCR-6MD, обладающего связывающей группой против CD19 клона 5-9, содержащей аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 55 и 54); и 6) Клон 5-13 abTCR (8×10^6 Т-клеток, трансдуцированных с использованием abTCR-6MD, обладающего связывающей группой против CD19 клона 5-13, содержащей аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 56 и 54).

[0520] Животных тщательно мониторируют после имплантации опухоли и введения дозы из 8 миллионов положительных по рецептору Т-клеток. Животных взвешивали, и визуализацию Xenogen проводили дважды в неделю на протяжении исследования. Животных, для которых показали следующие условия, подвергали эвтаназии и регистрировали как «смерть при соблюдении условий»: а) острый неблагоприятный ответ: затрудненное дыхание, дрожь, пассивное поведение (потеря аппетита и летаргия); б) потеря массы тела более чем 25% от начальной массы тела; и с) паралич конечностей, влияющий на движение мыши.

[0521] Результаты этого эксперимента изображены на фиг. 35, где показан график общего потока излучения из опухоли в зависимости от суток после дозирования клеток с abTCR или контроля. Все 4 из Т-клеток с CD19-abTCR, нацеливались на положительные по CD19 опухоли Raji *in vivo* и лизировали их, показывая эффективность антител против CD19 на платформе abTCR для подавления роста опухолей.

[0522] В другом эксперименте, мышей NSG без имплантированных опухолей обрабатывали с использованием 8×10^6 Т-клеток, трансдуцированных с использованием abTCR-6MD против CD19 или CAR против CD19 с одинаковыми связывающими последовательностями, и сравнивали эффект этих трансдуцированных Т-клеток *in vivo*. Мыши, обработанные с использованием Т-клеток с CAR против CD19 умирали в пределах 24 часов, в то время как мыши, обработанные с использованием Т-клеток с abTCR против CD19 выживали через 5 недель. Этот результат показывает, что Т-клетки, экспрессирующие конструкции abTCR, являются более безопасными, чем Т-клетки, экспрессирующие CAR.

Сравнение abTCR против CD19 и CAR против CD19

[0523] Клетки Raji В-клеточной лимфомы Raji-luc-GFP имплантировали мышам NSG, как описано выше. Затем мышам инъецировали 5×10^6 abTCR⁺ Т-клеток, трансдуцированных с использованием abTCR-6MD клона 5-13 (abTCR-6MD, обладающего связывающей группой против CD19 клона 5-13, содержащей аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 56 и 54), 5×10^6 CAR⁺ Т-клеток, трансдуцированных с использованием CAR клона 5-13 (CAR, обладающего связывающей

группой против CD19 клона 5-13), или 5×10^6 подвергнутых ложной трансдукции Т-клеток в группах по восемь мышей на инъеклируемый образец. Сыворотку собирали через 24 часа после имплантации Т-клеток, и концентрацию цитокинов человека в сыворотке измеряли с использованием устройства Luminex Magpix, как описано выше. Результаты измерения уровня цитокинов показаны на фиг. 36. Опухолевую нагрузку измеряли посредством активности люциферазы, как описано ранее, и результаты показаны на ФИГ. 37 (количественная оценка) и 27 (визуализация).

[0524] При прямом сравнении Т-клеток с CAR клона 5-13 и Т-клеток с abTCR клона 5-13, Т-клетки с abTCR, инъекцированные мышам, приводили к быстрой регрессии опухолей по сравнению с Т-клетками с CAR в ранних временных точках, в то время как для мышей после инъекции Т-клеток с CAR не показано регрессии опухолей до приблизительно пяти суток. На протяжении этого эксперимента, для Т-клеток с abTCR клона 5-13 показана более высокая эффективность подавления опухолей *in vivo*, чем для Т-клеток с CAR клона 5-13. Результаты измерения уровня цитокинов через 24 час показывают, что мыши после обработки Т-клетками с abTCR клона 5-13 также обладали меньшими уровнями секреции цитокинов, чем мыши после обработки Т-клетками с CAR. Эти результаты предоставляют доказательство того, что противоопухолевая эффективность не обязательно приводит к сверхпродукции цитокинов, поскольку Т-клетки с abTCR обладают более высокой активностью подавления опухолей, но оказывают более слабые эффекты секреции цитокинов, чем Т-клетки с CAR.

[0525] Через 7 недель после имплантации опухолей, ни одна из мышей после обработки Т-клетками с abTCR клона 5-13 не имела поддающихся детекции опухолей. В это время, 3 мышам из группы обработки подвергнутыми ложной трансдукции Т-клетками и 3 мышам из группы обработки Т-клетками с abTCR клона 5-13 повторно вводили посредством *i.v.* имплантации 5×10^5 клеток лимфомы Raji. Опухолевую нагрузку измеряли посредством активности люциферазы, как описано ранее, и результаты показаны на фиг. 39. В то время как опухоли быстро росли у мышей из группы обработки подвергнутыми ложной трансдукции Т-клетками, предшествующая обработка Т-клетками, трансдуцированными abTCR клона 5-13, предотвращала рост опухолей после повторного введения клеток лимфомы Raji посредством имплантации, что указывает на то, что трансдуцированные abTCR Т-клетки персистировали и сохраняли свою способность отвечать на антиген.

[0526] В другом эксперименте, сыворотку собирали от мышей NSG через 24 часа после инъекции либо 5×10^6 Т-клеток с abTCR-6MD клона 5-3 (abTCR-6MD, обладающего связывающей группой против CD19 клона 5-3, содержащей аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 42 и 43), либо 5×10^6 Т-клеток с CAR клона 5-3 (CAR, обладающего связывающей группой против CD19 клона 5-3, SEQ ID NO: 44). Концентрацию цитокинов в сыворотке мыши измеряли, как описано выше. Высокие уровни происходящих из Т-клеток цитокинов человека и происходящего из мыши IL-6 обнаружены у мышей после обработки Т-клетками с CAR клона 5-3. В отличие от этого, для мышей после обработки abTCR клона 5-3 показаны намного более низкие уровни цитокинов в сыворотке (данные не представлены), что предоставляет дополнительное доказательство уменьшенного эффекта Т-клеток с abTCR на сверхпродукцию цитокинов.

Противоопухолевая активность *in vivo* для антитела против CD19 в модели ксенотрансплантата лейкоза

[0527] Противоопухолевую активность *in vivo* Т-клеток, трансдуцированных с использованием CAR или abTCR, содержащих иллюстративную связывающую группу

антитела против hCD19, тестировали в модели ксенотрансплантата положительного по CD19 лейкоза человека на мышах NSG. Клетки NALM-6-luc-GFP получили в дар от Eric Smith's Lab в Memorial Sloan Kettering Cancer Center и культивировали в среде RPMI+10% FBS при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. Клетки NALM-6-luc-GFP

5 получены из положительной по CD19 линии клеток острого лимфобластного лейкоза, NALM-6, после стабильной трансфекции двумя репортерными генами, кодирующими как люциферазу светляка (luc), так и зеленый флуоресцентный белок, с получением в результате клеток, которые можно отслеживать *in vivo* с использованием билюминесцентной визуализации. Мышей NSG закупили из Jackson Laboratories (Bar

10 Harbor, ME USA 04609) и акклиматизировали в течение по меньшей мере 3 суток до эксперимента. Клетки NALM-6-luc-GFP ресуспендировали в PBS и имплантировали внутривенно (*i.v.*) тридцати самкам мышей NSG в возрасте 6-8 недель через хвостовую вену при 5×10^5 клеток/100 мкл/мышь. Через четверо суток после имплантации опухоли, животных подвергали визуализации с использованием системы визуализации Xenogen

15 IVIS для оценки опухолевой нагрузки. Мышей случайным образом распределяли, на основании испускания фотонов, на следующие четыре группы: (i) Носитель, только PBS (n=6 мышей); (ii) 10×10^6 подвергнутых ложной трансдукции Т-клеток человека (n=6 мышей); (iii) 5×10^6 Т-клеток с CAR клона 5-13 (Т-клеток, трансдуцированных с использованием CAR, обладающего связывающей группой против CD19 клона 5-13) (n=8 мышей); и (iv) 5×10^6 Т-клеток с abTCR-6MD клона 5-13 (Т-клеток, трансдуцированных с использованием abTCR-6MD, обладающего связывающей группой против CD19 клона 5-13, содержащей аминокислотные последовательности из SEQ ID

20 NO: 56 и 54) (n=8 мышей).

25 [0528] Животных тщательно мониторировали после имплантации опухоли и введения дозы положительных по рецептору Т-клеток. Животных взвешивали, и визуализацию Xenogen проводили дважды в неделю на протяжении исследования. Животных, для которых показали следующие условия, подвергали эвтаназии и регистрировали как «смерть при соблюдении условий»: а) острый неблагоприятный ответ: затрудненное

30 дыхание, дрожь, пассивное поведение (потеря аппетита и летаргия); б) потеря массы тела более чем 25% от начальной массы тела; и с) паралич конечностей, влияющий на движение мыши.

[0529] Результаты этого эксперимента изображены на фиг. 40, где показан график среднего общего потока излучения, происходящего из опухолей, для каждой группы

35 обработки в зависимости от суток после обработки. Как Т-клетки с abTCR клона 5-13, так и Т-клетки с CAR клона 5-13, нацеливались на положительные по CD19 опухоли NALM-6 *in vivo* и лизировали их, показывая эффективность антител против CD19 на платформе abTCR для подавления роста опухолей во множестве моделей опухолей.

40 [0530] Через 24 часа после обработки, кровь отбирали у 3 мышей на группу для измерения уровней цитокинов, и результаты показаны на фиг. 41. Как и для модели ксенотрансплантата лимфомы, обработка Т-клетками с abTCR против CD19 в этой модели ксенотрансплантата лейкоза приводила к более низким уровням секреции цитокинов, чем обработка Т-клетками с CAR против CD19.

45 [0531] На 7 сутки и 13 сутки после обработки, кровь отбирали у репрезентативных мышей для каждой группы и анализировали посредством проточной цитометрии с использованием набора «123count eBeads» от Affymetrix eBioscience, Inc. для определения количества CD3+ Т-клеток, экспрессирующих CAR/abTCR Т-клеток и клеток опухолей на мкл крови, и уровня экспрессии PD-1 на Т-клетках. На 13 сутки после обработки, 2

мышей на группу подвергали эвтаназии, и экстракты костного мозга анализировали посредством проточной цитометрии по CD3+/CAR/abTCR Т-клеткам, присутствию клеток опухолей и уровням экспрессии PD-1 на Т-клетках.

[0532] Мыши после введения Т-клеток с abTCR обладали более высокими уровнями в крови экспрессирующих химерный рецептор Т-клеток, на сутки как 7, так и 13 после введения, чем наблюдали для мышей после введения Т-клеток с CAR (ФИГ. 42), что указывает на то, что Т-клетки с abTCR обладали более высокими уровнями жизнеспособности и/или пролиферации, чем эквивалентные им Т-клетки с CAR в этой модели. Как показано на ФИГ. 43 и 44, в то время как для мышей после обработки либо Т-клетками с CAR, либо Т-клетками с abTCR, показано уменьшение количества клеток опухолей (показано по окрашиванию FITC) как в периферической крови, так и в костном мозге, по сравнению с контрольными животными после обработки носителем и ложной обработки на 13 сутки после обработки, уменьшение количества клеток опухолей как в периферической крови, так и в костном мозге, было больше для животных после обработки Т-клетками с abTCR. Как показано на ФИГ. 45 и 46, уровень экспрессии PD-1, маркера истощения Т-клеток, на поверхности Т-клеток как из периферической крови, так и из костного мозга, был ниже у мышей после обработки Т-клетками с abTCR, чем у мышей после обработки Т-клетками с CAR, и сравнимым с уровнями, наблюдаемыми у мышей после ложной обработки, как для CD4⁺, так и для CD8⁺ Т-клеток. Эти результаты позволяют предполагать, что экспрессирующие abTCR Т-клетки могут с меньшей вероятностью подвергаться истощению, чем экспрессирующие CAR Т-клетки.

Список последовательностей

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
1	Трансмембранный домен TCR α	ILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
2	Трансмембранный домен TCR β	TILYEILLGKATLYAVLVSALVL
3	Трансмембранный домен TCR δ	MLFAKTVAVNFLLTAKLFFL
4	Трансмембранный домен TCR γ	YYMYLLLLLKSVVYFAITCCLL
5	Соединительный пептид TCR α	ESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFR
6	Соединительный пептид TCR β	ADCGFTSVSYQQGVLSA
7	Соединительный пептид TCR δ	DHVKPKETENTKQPSKSKCHKPKAIVHTEKVNMMSLTVLGLR
8	Соединительный пептид TCR γ	MDPKDNCSDANDTLLLQLTNTSA
9	Соединительный пептид-MD TCR α	IPEDTFFPSPSSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFR
10	Соединительный пептид-MD TCR β	GRADCGFTSVSYQQGVLSA
11	Соединительный пептид-MD TCR δ	EVKTDSTDHVKPKETENTKQPSKSKCHKPKAIVHTEKVNMMSLTVLGLR
12	Соединительный пептид-MD TCR γ	PIKTDVITMDPKDNCSDANDTLLLQLTNTSA
13	Внутриклеточный домен TCR β	MAMVVRKDF
14	Внутриклеточный домен TCR γ	RRTAFCCNGEKS
15	TCRD-альфа	ESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
16	TCRD-бета	ADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVVRKDF
17	TCRD-альфа-MD	IPEDTFFPSPSSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

	18	TCRD-бета-MD	GRADCGFTSVSYQQGVL SATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKKRDF
	19	TCRD-дельта	DHV KPKETENTKQPSK SCHKPKAIVHTEKVNMMSLTVLGLRMLFAKTVAVNFLLLAKLFFL
	20	TCRD-гамма	MDPKDNC SKDANDTLLLQLTNTSAYMYLLLLLKS VVYFAITCCLLRRTAFCCNGEKS
5	21	TCRD-дельта MD	EVKTDSTDHV KPKETENTKQPSK SCHKPKAIVHTEKVNMMSLTVLGLRMLFAKTVAVNFLLLAKLFFL
	22	TCRD-гамма MD	PIKTDVITMDPKDNC SKDANDTLLLQLTNTSAYMYLLLLLKS VVYFAITCCLLRRTAFCCNGEKS
	23	анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-3-альфа	EVQLVQSGAEVKKPGESLTISCKASGYSFPNYWITWVRQMSGGGLEWMGRIDPGDSYTTYNPSFQG HVTISIDKSTNTAYLHWNSLKASDTAMY YCARYVSVLVDIWGQGTILVTVSSASTKGPSVFP LAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKRVEPKSCESSCDV KLV EKS FETDTNLNFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMTRLRWS
10	24	анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-3-бета	QSVLTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDNNRPSEVSNRFGSG KSGNTASLTISGLQAEDEADY YCSSYTTGSRVAVFGGGTKLTVLGGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECSADCFTSVSYQQGVL SATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKKRDF
	25	анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-4-альфа	QSVLTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDNNRPSEVSNRFGSG KSGNTASLTISGLQAEDEADY YCSSYTTGSRVAVFGGGTKLTVLGGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECSSESCDV KLV EKS FETDTNLNFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMTRLRWS
15	26	анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-4-бета	EVQLVQSGAEVKKPGESLTISCKASGYSFPNYWITWVRQMSGGGLEWMGRIDPGDSYTTYNPSFQG HVTISIDKSTNTAYLHWNSLKASDTAMY YCARYVSVLVDIWGQGTILVTVSSASTKGPSVFP LAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKRVEPKSCADCGFTSVSYQQGVL SATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKKRDF
	27	анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-4MD-альфа	QSVLTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDNNRPSEVSNRFGSG KSGNTASLTISGLQAEDEADY YCSSYTTGSRVAVFGGGTKLTVLGGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECSIPEDTFFPSPSSCDV KLV EKS FETDTNLNFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMT LRLWSS
20	28	анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-4MD-бета	EVQLVQSGAEVKKPGESLTISCKASGYSFPNYWITWVRQMSGGGLEWMGRIDPGDSYTTYNPSFQG HVTISIDKSTNTAYLHWNSLKASDTAMY YCARYVSVLVDIWGQGTILVTVSSASTKGPSVFP LAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKRVEPKSCGRADCGFTSVSYQQGVL SATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKKRDF
	29	анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-5-дельта	QSVLTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDNNRPSEVSNRFGSG KSGNTASLTISGLQAEDEADY YCSSYTTGSRVAVFGGGTKLTVLGGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECSDHVKPKETENTKQPSK SCHKPKAIVHTEKVNMMSLTVLGLRMLFAKTVAVNFLLLAKLFFL
25	30	анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-5-гамма	EVQLVQSGAEVKKPGESLTISCKASGYSFPNYWITWVRQMSGGGLEWMGRIDPGDSYTTYNPSFQG HVTISIDKSTNTAYLHWNSLKASDTAMY YCARYVSVLVDIWGQGTILVTVSSASTKGPSVFP LAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKRVEPKSCMDPKDNC SKDANDTLLLQLTNTSAYMYLLLLLKS VVYFAITCCLLRRTAFCCNGEKS
30	31	анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-5MD-дельта	QSVLTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDNNRPSEVSNRFGSG KSGNTASLTISGLQAEDEADY YCSSYTTGSRVAVFGGGTKLTVLGGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECSEVKT DSTDHVKPKETENTKQPSK SCHKPKAIVHTEKVNMMSLTVLGLRMLFAKTVAVNFLLLAKLFFL
	32	анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-5MD-гамма	EVQLVQSGAEVKKPGESLTISCKASGYSFPNYWITWVRQMSGGGLEWMGRIDPGDSYTTYNPSFQG HVTISIDKSTNTAYLHWNSLKASDTAMY YCARYVSVLVDIWGQGTILVTVSSASTKGPSVFP LAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKRVEPKSCPIKTDVITMDPKDNC SKDANDTLLLQLTNTSAYMYLLLLLKS VVYFAITCCLLRRTAFCCNGEKS
35	33	анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-6-дельта	EVQLVQSGAEVKKPGESLTISCKASGYSFPNYWITWVRQMSGGGLEWMGRIDPGDSYTTYNPSFQG HVTISIDKSTNTAYLHWNSLKASDTAMY YCARYVSVLVDIWGQGTILVTVSSASTKGPSVFP LAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKRVEPKSCDHVKPKETENTKQPSK SCHKPKAIVHTEKVNMMSLTVLGLRMLFAKTVAVNFLLLAKLFFL
40	34	анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-6-гамма	QSVLTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDNNRPSEVSNRFGSG KSGNTASLTISGLQAEDEADY YCSSYTTGSRVAVFGGGTKLTVLGGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECSMDPKDNC SKDANDTLLLQLTNTSAYMYLLLLLKS VVYFAITCCLLRRTAFCCNGEKS
	35	анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-6MD-дельта	EVQLVQSGAEVKKPGESLTISCKASGYSFPNYWITWVRQMSGGGLEWMGRIDPGDSYTTYNPSFQG HVTISIDKSTNTAYLHWNSLKASDTAMY YCARYVSVLVDIWGQGTILVTVSSASTKGPSVFP LAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKRVEPKSCEVKT DSTDHVKPKETENTKQPSK SCHKPKAIVHTEKVNMMSLTVLGLRMLFAKTVAVNFLLLAKLFFL
45	36	анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-6MD-гамма	QSVLTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDNNRPSEVSNRFGSG KSGNTASLTISGLQAEDEADY YCSSYTTGSRVAVFGGGTKLTVLGGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECSPIKTDVITMDPKDNC SKDANDTLLLQLTNTSAYMYLLLLLKS VVYFAITCCLLRRTAFCCNGEKS

5	37	CAR анти-AFP158/ HLA-A*02:01-scFv	QSVLTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGINVYVSWYQQHPGKAPKLMYDVENRNPSEVSNRFGSG KSGNTASLTISGLQAEDEADYCYSSYTTGSRVAFGGGKLTVLGSRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG VQLVQSGAEVKKPGESLTISCKASGYSFPNYWITWVRQMSGGGLEWMGRIDPGDSYTTYNPSFQGH VTISIDKSTNTAYLHWNSLKASDTAMYCYARYVVSVDIWGQGTLLVTVSSAAAIEVMYPPPYLDNE KSNGTIIHVKGKHLCPSPFPSPKPFVVLVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMN TPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNLNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR
	38	Домен IgVH антиге- ла против AFP158/ HLA-A*02:01	EVQLVQSGAEVKKPGESLTISCKASGYSFPNYWITWVRQMSGGGLEWMGRIDPGDSYTTYNPSFQGH HVTISIDKSTNTAYLHWNSLKASDTAMYCYARYVVSVDIWGQGTLLVTVSS
	39	Домен CH1 IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSC
10	40	Домен IgVL антиге- ла против AFP158/ HLA-A*02:01	QSVLTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGINVYVSWYQQHPGKAPKLMYDVENRNPSEVSNRFGSG KSGNTASLTISGLQAEDEADYCYSSYTTGSRVAFGGGKLTVL
	41	Домен IgCL	GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPKSKQSNKY AASSYLSLTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
15	42	анти-CD19-abTCR- 6MD-дельта	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDFRYSPSFQGH VTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCYARQVWGWQGGMYPRSNWWYNMDSWGQGTLLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCVETDSTDHVVKPKETENTKQPSKSKCHKPKAIV HTEKVNMMSLTVLGLRMLFAKTVAVNFLLLAKLFFL
	43	анти-CD19-abTCR- 6MD-гамма	LPVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNGSKSVHWYQQKPGQAPVLLVYDDSNRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEADYCYQVWDSSEYVVFVGGGKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLV CLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPKSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQVTHEG STVEKTVAPTECSPKIDVITMDPKDNCSKDANDTLLQLTNTSAYMYLLLLLKSIVYFAITCCLL RRTAFCCNGEKS
20	44	CAR анти-CD19-scFv	LPVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNGSKSVHWYQQKPGQAPVLLVYDDSNRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEADYCYQVWDSSEYVVFVGGGKLTVLGSRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG LVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDFRYSPSFQGH SADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCYARQVWGWQGGMYPRSNWWYNMDSWGQGTLLVTVSSAAA IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPSPKPFVVLVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVRS KRSRLLHSDYMNMTTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNLNELNL GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALPPR
25	45	Домен IgVH антиге- ла против CD19	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDFRYSPSFQGH VTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCYARQVWGWQGGMYPRSNWWYNMDSWGQGTLLVTVSS
	46	Домен IgVL антиге- ла против CD19	LPVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNGSKSVHWYQQKPGQAPVLLVYDDSNRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEADYCYQVWDSSEYVVFVGGGKLTVL
	47	Фрагмент CD28	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPSPKPFVVLVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVRS KRSRLLHSDYMNMTTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
	48	Фрагмент CD3-зета	RVKFSRSADAPAYQQGQNLNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK KMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
30	49	Сигнальный пептид	METDTLLLVVLLVWPGSTG
	50	Метка HA	YPYDVPDYA
	51	Метка 3x Flag	DYKDDHGDYKDDHIDYKDDDDK
	52	Метка мус	EQKLISEEDL
	53	AFP158	FMNKFYIEI
35	54	abTCR-6MD-гамма против CD19, клон 5	LPVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNGSKSVHWYQQKPGQAPVLLVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEADYCYQVWDSSEYVVFVGGGKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLV CLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPKSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQVTHEG STVEKTVAPTECSPKIDVITMDPKDNCSKDANDTLLQLTNTSAYMYLLLLLKSIVYFAITCCLL RRTAFCCNGEKS
	55	abTCR-6MD-дельта против CD19, клон 5-9	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDFRYSPFFQGH VTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCYARQVWGWQGGMYPRSNWWYNMDSWGQGTLLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCVETDSTDHVVKPKETENTKQPSKSKCHKPKAIV HTEKVNMMSLTVLGLRMLFAKTVAVNFLLLAKLFFL
40	56	abTCR-6MD-дельта против CD19, клон 5-13	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDFRYSPSFQGH VTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCYARQVWGWQGGMYPRSNWWYNMDSWGQGTLLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCVETDSTDHVVKPKETENTKQPSKSKCHKPKAIVH TEKVNMMSLTVLGLRMLFAKTVAVNFLLLAKLFFL
	57	Домен IgVL антиге- ла против CD19, клон 5	LPVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNGSKSVHWYQQKPGQAPVLLVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEADYCYQVWDSSEYVVFVGGGKLTVL
45	58	Домен IgVH антиге- ла против CD19, клон 5-9	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDFRYSPFFQGH VTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCYARQVWGWQGGMYPRSNWWYNMDSWGQGTLLVTVSS
	59	Домен IgVH антиге- ла против CD19, клон 5-13	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDFRYSPSFQGH VTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCYARQVWGWQGGMYPRSNWWYNMDSWGQGTLLVTVSS

60	CH1 IgG2-0C	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVVERK
61	CH1 IgG2-1C	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVVERKC
62	CH1 IgG2-2C	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVVERKCC
63	CH1 IgG3	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTP
64	CH1 IgG4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG
65	CH1 IgA1	ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNNVIAACLVQGGFFQEPESVTWSESGQGVARNFPPSQDASGDLYTTSS QLTLPATQCLAGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPCPVSTPPTSPSTPPTSPS
66	CH1 IgA2	ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACLQGGFFQEPESVTWSESGQNVARNFPPSQDASGDLYTTSS QLTLPATQCPDGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPCPVPPPP
67	CH1 IgD	APTKAPDVFPPIISGCRHPKDNNSPVVLAACLTIGYHPTSVTVTWYMGTSQPQRTPFEIQRRDSYMTSS QLSTPLQQWRQGEYKCVQHTASKSKKEIFRWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRN TGRGGEEKKEKEKEKEEERETKTP
68	CH1 IgE	ASTQSPSVFPLTRCCKNIPSNATSVTLGCLATGYFPEPVMVTDWDTGSLNGTMTLTPATTLTSLGHYAT ISLLTVSGAWAKQMFTCRVAHTPSSDWDVNDKTF
69	CH1 IgM	GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITLSWKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATS QVLLPSKDVMQGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLP
70	Костимулирующий фрагмент CD28	RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
71	Костимулирующий фрагмент 4-1BB	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPPEEEGGCEL
72	Домен IgVH антиге- ла против NY-ESO- 1/HLA-A*02:01, клон 35	QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSCASGDTFSSYSISWVRQAPGGLEWMGRIIPILGIANYAQKYQGR VTLADKSTSTSYMELNSLRSEDTAVYYCARDWSYSIDYWGQGTLVTVSS
73	Домен IgVL антиге- ла против NY-ESO- 1/HLA-A*02:01, клон 35	QSVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSG TSATLGITGLQTGDEADY YCGTWSSLSAWVFGGGTKLTVLG
74	Линкер scFv	SRGGGGSGGGGSGGGGSELEMA
75	анти-CD19-сTCR- дельта	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKSGSYSTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGHYIPGDSDRYSPSFQGG VTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMY YCARQVWGQGGMYPRSNWYVNLDSWGQGTLVTVSSR SQPHTKPSVFMKNGTNAVACLVEFYKPKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAV KLGKYEDSNS VTCVQHDNKT VHSDFEVKTDSTDHV KPKETENTKQPSK SCHKPKAIVHTEKVNMMSLTVLGLRM LFAKTAVNFLTAKLFFL
76	анти-CD19-сTCR- гамма	LPVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNGSKSVHWYQKPGQAPVLVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEADY YCQVWDSSDYVVFVGGGKTLTVLGDQQLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQK AGTYLCLLEKFFPDV I KIHVQEKKSNTILGSQEGNTMKTNDTYMKFSWLT VPEKSLDKEHRCIVRHE NNKNGVDQEIIFPIKTDVITMDPKDNC SKDANDTLLQLTNTSAYMYLLLLLKS VYFAITCCLL RRTAFCCNGEKS
77	Константный домен TCRα	PNIQNPDPAYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVVSQSKSDSVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAW SNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDV KLVKESFETDNLNFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMT LRLWSS
78	Константный домен TCRβ	EDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWVWNGKEVHSGVSTDPQLKEQP ALNDSRYCLSSRLRVSATFVNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTDQRAKPVTVQIVSAEAWGRADCG FTSVSYQQGVLSATLVEILLGKATLYAVLVSAVLVLMAMVKKRDF
79	Константный домен TCRδ	SQPHTKPSVFMKNGTNAVACLVEFYKPKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAV KLGKYEDSNS VTCVQHDNKT VHSDFEVKTDSTDHV KPKETENTKQPSK SCHKPKAIVHTEKVNMMSLTVLGLRM LFAKTAVNFLTAKLFFL
80	Константный домен TCRγ	DKQLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGTYLCLLEKFFPDV I KIHVQEKKSNTILGSQEGNTMKTNDT YMKFSWLT VPEKSLDKEHRCIVRHE NNKNGVDQEIIFPIKTDVITMDPKDNC SKDANDTLLQLTN TSAYMYLLLLLKS VYFAITCCLLRRTAFCCNGEKS
81	абTCR-7-дельта про- тив AFP158/HLA- A*02:01	EVQLVQSGAEVKKPGESLTISCKASGYSFPNYWITWVRQMSGGGLVWGRIDPQDSTYTYNPSFQGG HVTISIDKSTNTAYLHWNLSKASDTAMY YCARYVSVLVDIWGQGTLVTVSSRSQPHTKPSVFMKN GTNAVACLVEFYKPKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAV KLGKYEDSNSVTCVQHDNKT VHS TDFEVKTDSTDHV KPKETENTKQPSK SCHKPKAIVHTEKVNMMSLTVLGLRMLFAKTAVNFLTAKL KFFL
82	абTCR-7-гамма про- тив AFP158/HLA- A*02:01	QSVLTQPASVSGSPGQSITISCTGTSDDVGGYNYVSWYQHPGKAPKLMYDNNRPEVSNRFGSG KSGNTASLTISGLQAEDEADY YCSSYTTGSRVAVFGGGTKLTVLGDQQLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQ KAGTYLCLLEKFFPDV I KIHVQEKKSNTILGSQEGNTMKTNDTYMKFSWLT VPEKSLDKEHRCIVRHE ENKNGVDQEIIFPIKTDVITMDPKDNC SKDANDTLLQLTNTSAYMYLLLLLKS VYFAITCCL LRRRTAFCCNGEKS

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Eureka Therapeutics, Inc.

<120> ХИМЕРНЫЕ КОНСТРУКЦИИ АНТИТЕЛО/Т-КЛЕТОЧНЫЙ РЕЦЕПТОР И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

<130> 750042000340
 <140> Еще не присвоен
 <141> Совместно с настоящим
 <150> US 62/245,944
 5 <151> 2015-10-23
 <150> US 62/304,918
 <151> 2016-03-07
 <150> US 62/345,649
 <151> 2016-06-03
 10 <150> US 62/369,694
 <151> 2016-08-01
 <160> 82
 <170> FastSEQ для Windows версии 4.0
 <210> 1
 15 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Трансмембранный домен TCR-альфа
 20 <400> 1
 Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg
 1 5 10 15
 Leu Trp Ser Ser
 20
 25 <210> 2
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 30 <223> Трансмембранный домен TCR-бета
 <400> 2
 Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val
 1 5 10 15
 Leu Val Ser Ala Leu Val Leu
 35 20
 <210> 3
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <220>
 <223> Трансмембранный домен TCR-дельта
 <400> 3
 Met Leu Phe Ala Lys Thr Val Ala Val Asn Phe Leu Leu Thr Ala Lys
 1 5 10 15
 45 Leu Phe Phe Leu
 20
 <210> 4
 <211> 23

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Трансмембранный домен TCR-гамма
 5 <400> 4
 Tyr Tyr Met Tyr Leu Leu Leu Leu Leu Lys Ser Val Val Tyr Phe Ala
 1 5 10 15
 Ile Ile Thr Cys Cys Leu Leu
 20
 10 <210> 5
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 15 <223> Соединительный пептид TCR-альфа
 <400> 5
 Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp
 1 5 10 15
 Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg
 20 20 25 30
 <210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <220>
 <223> Соединительный пептид TCR-бета
 <400> 6
 Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser
 1 5 10 15
 30 Ala
 <210> 7
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <220>
 <223> Соединительный пептид TCR-дельта
 <400> 7
 Asp His Val Lys Pro Lys Glu Thr Glu Asn Thr Lys Gln Pro Ser Lys
 1 5 10 15
 40 Ser Cys His Lys Pro Lys Ala Ile Val His Thr Glu Lys Val Asn Met
 20 25 30
 Met Ser Leu Thr Val Leu Gly Leu Arg
 35 40
 <210> 8
 45 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

<223> Соединительный пептид TCR-гамма
 <400> 8
 Met Asp Pro Lys Asp Asn Cys Ser Lys Asp Ala Asn Asp Thr Leu Leu
 1 5 10 15
 5 Leu Gln Leu Thr Asn Thr Ser Ala
 20
 <210> 9
 <211> 40
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Соединительный пептид-MD TCR-альфа
 <400> 9
 Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val
 15 1 5 10 15
 Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln
 20 25 30
 Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg
 35 40
 20 <210> 10
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 25 <223> Соединительный пептид-MD TCR-бета
 <400> 10
 Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val
 1 5 10 15
 Leu Ser Ala
 30 <210> 11
 <211> 48
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 35 <223> Соединительный пептид-MD TCR-дельта
 <400> 11
 Glu Val Lys Thr Asp Ser Thr Asp His Val Lys Pro Lys Glu Thr Glu
 1 5 10 15
 Asn Thr Lys Gln Pro Ser Lys Ser Cys His Lys Pro Lys Ala Ile Val
 40 20 25 30
 His Thr Glu Lys Val Asn Met Met Ser Leu Thr Val Leu Gly Leu Arg
 35 40 45
 <210> 12
 <211> 32
 45 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Соединительный пептид-MD TCR-гамма

<400> 12
 Pro Ile Lys Thr Asp Val Ile Thr Met Asp Pro Lys Asp Asn Cys Ser
 1 5 10 15
 Lys Asp Ala Asn Asp Thr Leu Leu Leu Gln Leu Thr Asn Thr Ser Ala
 5 20 25 30

<210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> Внутриклеточный домен TCR-бета
 <400> 13
 Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Phe
 1 5

15 <210> 14
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

20 <223> Внутриклеточный домен TCR-гамма
 <400> 14
 Arg Arg Thr Ala Phe Cys Cys Asn Gly Glu Lys Ser
 1 5 10

25 <210> 15
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> TCRD-альфа

30 <400> 15
 Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp
 1 5 10 15
 Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu
 20 25 30

35 Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp
 35 40 45
 Ser Ser
 50

40 <210> 16
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> TCRD-бета

45 <400> 16
 Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser
 1 5 10 15
 Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala

		20						25						30			
	Val	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Met	Ala	Met	Val	Lys	Arg	Lys	Asp	
			35					40					45				
	Phe																
5	<210>	17															
	<211>	60															
	<212>	PRT															
	<213>	Homo sapiens															
	<220>																
10	<223>	TCRD-альфа-MD															
	<400>	17															
	Ile	Pro	Glu	Asp	Thr	Phe	Phe	Pro	Ser	Pro	Glu	Ser	Ser	Cys	Asp	Val	
	1				5					10				15			
	Lys	Leu	Val	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Thr	Asp	Thr	Asn	Leu	Asn	Phe	Gln	
15				20					25					30			
	Asn	Leu	Ser	Val	Ile	Gly	Phe	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu	Lys	Val	Ala	Gly	
			35					40					45				
	Phe	Asn	Leu	Leu	Met	Thr	Leu	Arg	Leu	Trp	Ser	Ser					
		50					55					60					
20	<210>	18															
	<211>	51															
	<212>	PRT															
	<213>	Homo sapiens															
	<220>																
25	<223>	TCRD-бета-MD															
	<400>	18															
	Gly	Arg	Ala	Asp	Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Val	Ser	Tyr	Gln	Gln	Gly	Val	
	1				5					10					15		
	Leu	Ser	Ala	Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	
30				20					25					30			
	Tyr	Ala	Val	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Met	Ala	Met	Val	Lys	Arg	
			35					40					45				
	Lys	Asp	Phe														
		50															
35	<210>	19															
	<211>	61															
	<212>	PRT															
	<213>	Homo sapiens															
	<220>																
40	<223>	TCRD-дельта															
	<400>	19															
	Asp	His	Val	Lys	Pro	Lys	Glu	Thr	Glu	Asn	Thr	Lys	Gln	Pro	Ser	Lys	
	1				5					10					15		
	Ser	Cys	His	Lys	Pro	Lys	Ala	Ile	Val	His	Thr	Glu	Lys	Val	Asn	Met	
45				20					25					30			
	Met	Ser	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Leu	Arg	Met	Leu	Phe	Ala	Lys	Thr	Val	
			35					40					45				
	Ala	Val	Asn	Phe	Leu	Leu	Thr	Ala	Lys	Leu	Phe	Phe	Leu				

50 55 60

<210> 20
 <211> 59
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> TCRD-гамма
 <400> 20

Met Asp Pro Lys Asp Asn Cys Ser Lys Asp Ala Asn Asp Thr Leu Leu
 10 1 5 10 15
 Leu Gln Leu Thr Asn Thr Ser Ala Tyr Tyr Met Tyr Leu Leu Leu Leu
 20 25 30
 Leu Lys Ser Val Val Tyr Phe Ala Ile Ile Thr Cys Cys Leu Leu Arg
 35 40 45

15 Arg Thr Ala Phe Cys Cys Asn Gly Glu Lys Ser
 50 55

<210> 21
 <211> 68
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> TCRD-дельта-MD
 <400> 21

Glu Val Lys Thr Asp Ser Thr Asp His Val Lys Pro Lys Glu Thr Glu
 25 1 5 10 15
 Asn Thr Lys Gln Pro Ser Lys Ser Cys His Lys Pro Lys Ala Ile Val
 20 25 30
 His Thr Glu Lys Val Asn Met Met Ser Leu Thr Val Leu Gly Leu Arg
 35 40 45

30 Met Leu Phe Ala Lys Thr Val Ala Val Asn Phe Leu Leu Thr Ala Lys
 50 55 60

Leu Phe Phe Leu
 65

<210> 22
 35 <211> 67
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> TCRD-гамма-MD
 40 <400> 22

Pro Ile Lys Thr Asp Val Ile Thr Met Asp Pro Lys Asp Asn Cys Ser
 1 5 10 15
 Lys Asp Ala Asn Asp Thr Leu Leu Leu Gln Leu Thr Asn Thr Ser Ala
 20 25 30

45 Tyr Tyr Met Tyr Leu Leu Leu Leu Lys Ser Val Val Tyr Phe Ala
 35 40 45

Ile Ile Thr Cys Cys Leu Leu Arg Arg Thr Ala Phe Cys Cys Asn Gly
 50 55 60

Glu Lys Ser
65
<210> 23
<211> 270
5 <212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-3-альфа
<400> 23
10 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Pro Asn Tyr
20 25 30
Trp Ile Thr Trp Val Arg Gln Met Ser Gly Gly Gly Leu Glu Trp Met
15 35 40 45
Gly Arg Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Phe
50 55 60
Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ile Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
20 Leu His Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Tyr Tyr Val Ser Leu Val Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
25 115 120 125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160
30 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
35 195 200 205
Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Glu Ser Ser Cys
210 215 220
Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn
225 230 235 240
40 Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val
245 250 255
Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
260 265 270
<210> 24
45 <211> 265
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>

<223> анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-3-бета

<400> 24

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 5 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
 20 25 30
 Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 10 Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Glu Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Thr Gly
 85 90 95
 15 Ser Arg Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110
 Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 115 120 125
 Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
 145 150 155 160
 Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 165 170 175
 25 Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
 180 185 190
 Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
 195 200 205
 Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val
 210 215 220
 30 Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu
 225 230 235 240
 Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu
 245 250 255
 35 Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Phe
 260 265

<210> 25

<211> 266

<212> PRT

40 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-4-альфа

<400> 25

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 45 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
 20 25 30
 Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

RU 2 767 209 C2

35 40 45
 Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Glu Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 5 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Thr Gly
 85 90 95
 Ser Arg Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110
 10 Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 115 120 125
 Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
 15 145 150 155 160
 Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 165 170 175
 Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
 180 185 190
 20 Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
 195 200 205
 Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu
 210 215 220
 Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu
 25 225 230 235 240
 Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn
 245 250 255
 Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
 260 265
 30 <210> 26
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 35 <223> анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-4-бета
 <400> 26
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Pro Asn Tyr
 40 20 25 30
 Trp Ile Thr Trp Val Arg Gln Met Ser Gly Gly Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Phe
 50 55 60
 45 Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ile Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu His Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

RU 2767209 C2

Ala Arg Tyr Tyr Val Ser Leu Val Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125
5 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
10 165 170 175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205
15 Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Ala Asp Cys Gly
210 215 220
Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu
225 230 235 240
Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser
20 245 250 255
Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Phe
260 265
<210> 27
<211> 276
25 <212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-4MD-альфа
<400> 27
30 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30
Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 35 40 45
Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Glu Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80
40 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Thr Gly
85 90 95
Ser Arg Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110
Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
45 115 120 125
Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140
Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys

RU 2767209 C2

145 150 155 160
Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175
Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
5 180 185 190
Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205
Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro
210 215 220
10 Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu
225 230 235 240
Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg
245 250 255
Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg
15 260 265 270
Leu Trp Ser Ser
275
<210> 28
<211> 271
20 <212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-4MD-бета
<400> 28
25 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Pro Asn Tyr
20 25 30
Trp Ile Thr Trp Val Arg Gln Met Ser Gly Gly Gly Leu Glu Trp Met
30 35 40 45
Gly Arg Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Phe
50 55 60
Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ile Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
35 Leu His Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Tyr Tyr Val Ser Leu Val Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
40 115 120 125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160
45 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

RU 2767209 C2

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Arg Ala Asp
 210 215 220
 5 Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr
 225 230 235 240
 Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu
 245 250 255
 Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Phe
 10 260 265 270
 <210> 29
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 15 <220>
 <223> анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-5-дельта
 <400> 29
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 20 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
 20 25 30
 Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Glu Val Ser Asn Arg Phe
 25 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Thr Gly
 85 90 95
 30 Ser Arg Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110
 Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 115 120 125
 Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
 35 130 135 140
 Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
 145 150 155 160
 Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 165 170 175
 40 Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
 180 185 190
 Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
 195 200 205
 Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser Asp His Val Lys Pro Lys Glu Thr
 45 210 215 220
 Glu Asn Thr Lys Gln Pro Ser Lys Ser Cys His Lys Pro Lys Ala Ile
 225 230 235 240
 Val His Thr Glu Lys Val Asn Met Met Ser Leu Thr Val Leu Gly Leu

RU 2767209 C2

245 250 255
 Arg Met Leu Phe Ala Lys Thr Val Ala Val Asn Phe Leu Leu Thr Ala
 260 265 270
 Lys Leu Phe Phe Leu
 5 275
 <210> 30
 <211> 279
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 10 <220>
 <223> анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-5-гамма
 <400> 30
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 15 Ser Leu Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Pro Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Thr Trp Val Arg Gln Met Ser Gly Gly Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Phe
 20 50 55 60
 Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ile Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu His Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 25 Ala Arg Tyr Tyr Val Ser Leu Val Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 30 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 35 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Met Asp Pro Lys
 40 210 215 220
 Asp Asn Cys Ser Lys Asp Ala Asn Asp Thr Leu Leu Leu Gln Leu Thr
 225 230 235 240
 Asn Thr Ser Ala Tyr Tyr Met Tyr Leu Leu Leu Leu Leu Lys Ser Val
 245 250 255
 45 Val Tyr Phe Ala Ile Ile Thr Cys Cys Leu Leu Arg Arg Thr Ala Phe
 260 265 270
 Cys Cys Asn Gly Glu Lys Ser
 275

<210> 31
 <211> 284
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 5 <220>
 <223> анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-5MD-дельта
 <400> 31
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 10 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
 20 25 30
 Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 15 Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Glu Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Thr Gly
 85 90 95
 20 Ser Arg Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110
 Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 115 120 125
 25 Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
 145 150 155 160
 Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 165 170 175
 30 Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
 180 185 190
 Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
 195 200 205
 35 Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser Glu Val Lys Thr Asp Ser Thr Asp
 210 215 220
 His Val Lys Pro Lys Glu Thr Glu Asn Thr Lys Gln Pro Ser Lys Ser
 225 230 235 240
 Cys His Lys Pro Lys Ala Ile Val His Thr Glu Lys Val Asn Met Met
 245 250 255
 40 Ser Leu Thr Val Leu Gly Leu Arg Met Leu Phe Ala Lys Thr Val Ala
 260 265 270
 Val Asn Phe Leu Leu Thr Ala Lys Leu Phe Phe Leu
 275 280
 <210> 32
 45 <211> 287
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

RU 2767209 C2

<223> анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-5MD-гамма

<400> 32

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 5 Ser Leu Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Pro Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Thr Trp Val Arg Gln Met Ser Gly Gly Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 10 Gly Arg Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ile Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu His Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 15 Ala Arg Tyr Tyr Val Ser Leu Val Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 20 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 25 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Pro Ile Lys Thr
 210 215 220
 30 Asp Val Ile Thr Met Asp Pro Lys Asp Asn Cys Ser Lys Asp Ala Asn
 225 230 235 240
 Asp Thr Leu Leu Leu Gln Leu Thr Asn Thr Ser Ala Tyr Tyr Met Tyr
 245 250 255
 35 Leu Leu Leu Leu Leu Lys Ser Val Val Tyr Phe Ala Ile Ile Thr Cys
 260 265 270
 Cys Leu Leu Arg Arg Thr Ala Phe Cys Cys Asn Gly Glu Lys Ser
 275 280 285

<210> 33

40 <211> 281

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-6-дельта

45 <400> 33

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Pro Asn Tyr

RU 2767209 C2

20 25 30
 Trp Ile Thr Trp Val Arg Gln Met Ser Gly Gly Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Phe
 5 50 55 60
 Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ile Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu His Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 10 Ala Arg Tyr Tyr Val Ser Leu Val Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 15 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 20 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp His Val Lys
 25 210 215 220
 Pro Lys Glu Thr Glu Asn Thr Lys Gln Pro Ser Lys Ser Cys His Lys
 225 230 235 240
 Pro Lys Ala Ile Val His Thr Glu Lys Val Asn Met Met Ser Leu Thr
 245 250 255
 30 Val Leu Gly Leu Arg Met Leu Phe Ala Lys Thr Val Ala Val Asn Phe
 260 265 270
 Leu Leu Thr Ala Lys Leu Phe Phe Leu
 275 280
 <210> 34
 35 <211> 275
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-6-гамма
 40 <400> 34
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
 20 25 30
 45 Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Glu Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

RU 2767209 C2

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Thr Gly
85 90 95
5 Ser Arg Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110
Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125
10 Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140
Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
145 150 155 160
Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175
15 Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190
Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205
20 Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser Met Asp Pro Lys Asp Asn Cys Ser
210 215 220
Lys Asp Ala Asn Asp Thr Leu Leu Leu Gln Leu Thr Asn Thr Ser Ala
225 230 235 240
Tyr Tyr Met Tyr Leu Leu Leu Leu Lys Ser Val Val Tyr Phe Ala
245 250 255
25 Ile Ile Thr Cys Cys Leu Leu Arg Arg Thr Ala Phe Cys Cys Asn Gly
260 265 270
Glu Lys Ser
275
<210> 35
30 <211> 288
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-6MD-дельта
35 <400> 35
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Pro Asn Tyr
20 25 30
40 Trp Ile Thr Trp Val Arg Gln Met Ser Gly Gly Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Arg Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Phe
50 55 60
45 Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ile Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu His Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Tyr Tyr Val Ser Leu Val Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu

RU 2767209 C2

		100						105					110			
	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu
			115					120					125			
	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys
5			130					135					140			
	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser
	145					150					155				160	
	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser
					165					170					175	
10	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
				180					185				190			
	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn
			195					200					205			
	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Glu	Val	Lys	Thr
15			210					215					220			
	Asp	Ser	Thr	Asp	His	Val	Lys	Pro	Lys	Glu	Thr	Glu	Asn	Thr	Lys	Gln
	225				230					235					240	
	Pro	Ser	Lys	Ser	Cys	His	Lys	Pro	Lys	Ala	Ile	Val	His	Thr	Glu	Lys
					245					250					255	
20	Val	Asn	Met	Met	Ser	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Leu	Arg	Met	Leu	Phe	Ala
				260					265					270		
	Lys	Thr	Val	Ala	Val	Asn	Phe	Leu	Leu	Thr	Ala	Lys	Leu	Phe	Phe	Leu
			275					280					285			
	<210>	36														
25	<211>	283														
	<212>	PRT														
	<213>	Искусственная последовательность														
	<220>															
	<223>	анти-AFP158/HLA-A*02:01-abTCR-6MD-гамма														
30	<400>	36														
	Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Ala	Ser	Val	Ser	Gly	Ser	Pro	Gly	Gln
	1				5					10				15		
	Ser	Ile	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Val	Gly	Gly	Tyr
			20					25					30			
35	Asn	Tyr	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	His	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu
			35					40					45			
	Met	Ile	Tyr	Asp	Val	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser	Glu	Val	Ser	Asn	Arg	Phe
	50					55					60					
	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu
40	65				70						75				80	
	Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Ser	Tyr	Thr	Thr	Gly
				85				90					95			
	Ser	Arg	Ala	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gln
			100					105					110			
45	Pro	Lys	Ala	Asn	Pro	Thr	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Glu
			115					120					125			
	Leu	Gln	Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp	Phe	Tyr
			130					135					140			

RU 2767209 C2

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
145 150 155 160
Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175
5 Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190
Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205
Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser Pro Ile Lys Thr Asp Val Ile Thr
10 210 215 220
Met Asp Pro Lys Asp Asn Cys Ser Lys Asp Ala Asn Asp Thr Leu Leu
225 230 235 240
Leu Gln Leu Thr Asn Thr Ser Ala Tyr Tyr Met Tyr Leu Leu Leu
245 250 255
15 Leu Lys Ser Val Val Tyr Phe Ala Ile Ile Thr Cys Cys Leu Leu Arg
260 265 270
Arg Thr Ala Phe Cys Cys Asn Gly Glu Lys Ser
275 280
<210> 37
20 <211> 471
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> CAR анти-AFP158/HLA-A*02:01-scFv
25 <400> 37
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30
30 Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45
Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Glu Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
35 65 70 75 80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Thr Gly
85 90 95
Ser Arg Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ser
100 105 110
40 Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
115 120 125
Leu Glu Met Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
130 135 140
Lys Pro Gly Glu Ser Leu Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser
45 145 150 155 160
Phe Pro Asn Tyr Trp Ile Thr Trp Val Arg Gln Met Ser Gly Gly Gly
165 170 175
Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Thr Tyr

RU 2767209 C2

		180						185					190			
	Asn	Pro	Ser	Phe	Gln	Gly	His	Val	Thr	Ile	Ser	Ile	Asp	Lys	Ser	Thr
			195					200					205			
	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	His	Trp	Asn	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala
5		210					215					220				
	Met	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Val	Ser	Leu	Val	Asp	Ile	Trp	Gly
	225					230					235				240	
	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Ile	Glu	Val	Met
					245					250				255		
10	Tyr	Pro	Pro	Pro	Tyr	Leu	Asp	Asn	Glu	Lys	Ser	Asn	Gly	Thr	Ile	Ile
				260					265				270			
	His	Val	Lys	Gly	Lys	His	Leu	Cys	Pro	Ser	Pro	Leu	Phe	Pro	Gly	Pro
			275					280					285			
	Ser	Lys	Pro	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys
15		290					295				300					
	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Ser
	305					310					315				320	
	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr	Pro	Arg
					325					330				335		
20	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	Pro	Pro	Arg
					340					345				350		
	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp
			355					360					365			
	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn
25		370					375					380				
	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg
	385					390					395				400	
	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly
					405					410				415		
30	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu
				420						425				430		
	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu
			435					440					445			
	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His
35		450					455					460				
	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg									
	465					470										
	<210>	38														
	<211>	117														
40	<212>	PRT														
	<213>	Искусственная последовательность														
	<220>															
	<223>	Домен IgVH антитела против AFP158/HLA-A*02:01														
	<400>	38														
45	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
	1				5					10				15		
	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Pro	Asn	Tyr
				20					25					30		

RU 2767209 C2

Trp Ile Thr Trp Val Arg Gln Met Ser Gly Gly Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Phe
 50 55 60
 5 Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ile Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu His Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Tyr Val Ser Leu Val Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 10 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 39
 <211> 103
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Домен CH1 IgG1
 <400> 39
 20 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 25 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 30 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
 100
 <210> 40
 35 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Домен IgVL антитела против AFP158/HLA-A*02:01
 40 <400> 40
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
 20 25 30
 45 Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Glu Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

RU 2767209 C2

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Thr Gly
85 90 95
5 Ser Arg Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110
<210> 41
<211> 106
<212> PRT
10 <213> Homo sapiens
<220>
<223> Домен IgCL
<400> 41
Gly Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
15 1 5 10 15
Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
20 20 25 30
Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro
35 40 45
20 Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50 55 60
Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65 70 75 80
Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
25 85 90 95
Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105
<210> 42
<211> 301
30 <212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> анти-CD19-abTCR-6MD-дельта
<400> 42
35 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
40 35 40 45
Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60
Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
45 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gln Val Trp Gly Trp Gln Gly Gly Met Tyr Pro Arg Ser Asn
100 105 110

RU 2767209 C2

Trp Trp Tyr Asn Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
115 120 125

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
130 135 140

5 Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
145 150 155 160

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
165 170 175

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
10 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
195 200 205

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
210 215 220

15 Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Glu Val Lys Thr Asp Ser Thr
225 230 235 240

Asp His Val Lys Pro Lys Glu Thr Glu Asn Thr Lys Gln Pro Ser Lys
245 250 255

Ser Cys His Lys Pro Lys Ala Ile Val His Thr Glu Lys Val Asn Met
20 260 265 270

Met Ser Leu Thr Val Leu Gly Leu Arg Met Leu Phe Ala Lys Thr Val
275 280 285

Ala Val Asn Phe Leu Leu Thr Ala Lys Leu Phe Phe Leu
290 295 300

25 <210> 43
<211> 281
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>

30 <223> анти-CD19-abTCR-6MD-гамма
<400> 43

Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
35 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
35 40 45

Asp Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

40 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Glu Tyr
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
45 100 105 110

Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly

RU 2767209 C2

	130		135		140												
	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Gly	Ser	Pro	Val	Lys	Ala	Gly	
	145						150				155					160	
	Val	Glu	Thr	Thr	Lys	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn	Lys	Tyr	Ala	Ala	
5					165					170						175	
	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Lys	Ser	His	Arg	Ser	
				180					185					190			
	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	Glu	Lys	Thr	Val	
			195					200					205				
10	Ala	Pro	Thr	Glu	Cys	Ser	Pro	Ile	Lys	Thr	Asp	Val	Ile	Thr	Met	Asp	
	210						215					220					
	Pro	Lys	Asp	Asn	Cys	Ser	Lys	Asp	Ala	Asn	Asp	Thr	Leu	Leu	Leu	Gln	
	225				230					235						240	
	Leu	Thr	Asn	Thr	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Met	Tyr	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Lys	
15					245					250						255	
	Ser	Val	Val	Tyr	Phe	Ala	Ile	Ile	Thr	Cys	Cys	Leu	Leu	Arg	Arg	Thr	
				260					265					270			
	Ala	Phe	Cys	Cys	Asn	Gly	Glu	Lys	Ser								
			275					280									
20	<210>	44															
	<211>	482															
	<212>	PRT															
	<213>	Искусственная последовательность															
	<220>																
25	<223>	CAR анти-CD19-scFv															
	<400>	44															
	Leu	Pro	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ala	Pro	Gly	Lys	
	1			5					10					15			
	Thr	Ala	Arg	Ile	Thr	Cys	Gly	Gly	Asn	Asn	Ile	Gly	Ser	Lys	Ser	Val	
30				20					25					30			
	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Val	Val	Tyr	
			35					40					45				
	Asp	Asp	Ser	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	
	50					55						60					
35	Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Gly	
	65					70						75				80	
	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Val	Trp	Asp	Ser	Ser	Ser	Glu	Tyr	
				85						90				95			
	Val	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Ser	Arg	Gly	
40				100					105					110			
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Leu	Glu	
				115				120					125				
	Met	Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	
				130				135					140				
45	Gly	Glu	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	
	145					150						155				160	
	Ser	Tyr	Trp	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	
				165						170						175	

RU 2767209 C2

Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro
180 185 190
Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr
195 200 205
5 Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
210 215 220
Tyr Cys Ala Arg Gln Val Trp Gly Trp Gln Gly Gly Met Tyr Pro Arg
225 230 235 240
Ser Asn Trp Trp Tyr Asn Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
10 245 250 255
Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
260 265 270
Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys
275 280 285
15 His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp
290 295 300
Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val
305 310 315 320
Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu
20 325 330 335
Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr
340 345 350
Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr
355 360 365
25 Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln
370 375 380
Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu
385 390 395 400
Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly
30 405 410 415
Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu
420 425 430
Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly
435 440 445
35 Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser
450 455 460
Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro
465 470 475 480
Pro Arg
40 <210> 45
<211> 130
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
45 <223> Домен IgVH антитела против CD19
<400> 45
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

RU 2 767 209 C2

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 5 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 10 85 90 95
 Ala Arg Gln Val Trp Gly Trp Gln Gly Gly Met Tyr Pro Arg Ser Asn
 100 105 110
 Trp Trp Tyr Asn Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 115 120 125
 15 Ser Ser
 130
 <210> 46
 <211> 108
 <212> PRT
 20 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Домен IgVL антитела против CD19
 <400> 46
 Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys
 25 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
 35 40 45
 30 Asp Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Glu Tyr
 35 85 90 95
 Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105
 <210> 47
 <211> 107
 40 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> фрагмент CD28
 <400> 47
 45 Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
 1 5 10 15
 Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
 20 25 30

RU 2767209 C2

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
 35 40 45
 Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
 50 55 60
 5 Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn
 65 70 75 80
 Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr
 85 90 95
 Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 10 100 105
 <210> 48
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <220>
 <223> фрагмент CD3-зета
 <400> 48
 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 1 5 10 15
 20 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 20 25 30
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 35 40 45
 Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 25 50 55 60
 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 65 70 75 80
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 85 90 95
 30 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 100 105 110
 <210> 49
 <211> 20
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Сигнальный пептид
 <400> 49
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 40 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly
 20
 <210> 50
 <211> 9
 45 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> метка HA

<400> 50
 Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 1 5
 <210> 51
 5 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> метка 3x Flag
 10 <400> 51
 Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp Tyr
 1 5 10 15
 Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 20
 15 <210> 52
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 20 <223> метка мус
 <400> 52
 Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
 1 5 10
 <210> 53
 25 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> AFP158
 30 <400> 53
 Phe Met Asn Lys Phe Ile Tyr Glu Ile
 1 5
 <210> 54
 <211> 281
 35 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> abTCR-6MD-гамма против CD19, клон 5
 <400> 54
 40 Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
 45 35 40 45
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly

RU 2767209 C2

65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp Tyr
 85 90 95
 Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
 5 100 105 110
 Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
 115 120 125
 Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
 130 135 140
 10 Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys Ala Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
 165 170 175
 Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
 15 180 185 190
 Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
 195 200 205
 Ala Pro Thr Glu Cys Ser Pro Ile Lys Thr Asp Val Ile Thr Met Asp
 210 215 220
 20 Pro Lys Asp Asn Cys Ser Lys Asp Ala Asn Asp Thr Leu Leu Leu Gln
 225 230 235 240
 Leu Thr Asn Thr Ser Ala Tyr Tyr Met Tyr Leu Leu Leu Leu Lys
 245 250 255
 Ser Val Val Tyr Phe Ala Ile Ile Thr Cys Cys Leu Leu Arg Arg Thr
 25 260 265 270
 Ala Phe Cys Cys Asn Gly Glu Lys Ser
 275 280
 <210> 55
 <211> 301
 30 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> abTCR-6MD-дельта против CD19, клон 5-9
 <400> 55
 35 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 40 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Phe Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 45 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Val Trp Gly Trp Gln Gly Gly Met Tyr Pro Arg Ser Asn
 100 105 110

RU 2767209 C2

Trp Trp Tyr Asn Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 115 120 125
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 130 135 140
 5 Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 145 150 155 160
 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 165 170 175
 Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 10 180 185 190
 Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 195 200 205
 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 210 215 220
 15 Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Glu Val Lys Thr Asp Ser Thr
 225 230 235 240
 Asp His Val Lys Pro Lys Glu Thr Glu Asn Thr Lys Gln Pro Ser Lys
 245 250 255
 Ser Cys His Lys Pro Lys Ala Ile Val His Thr Glu Lys Val Asn Met
 20 260 265 270
 Met Ser Leu Thr Val Leu Gly Leu Arg Met Leu Phe Ala Lys Thr Val
 275 280 285
 Ala Val Asn Phe Leu Leu Thr Ala Lys Leu Phe Phe Leu
 290 295 300
 25 <210> 56
 <211> 301
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 30 <223> abTCR-6MD-дельта против CD19, клон 5-13
 <400> 56
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 35 20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 40 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Val Trp Gly Trp Gln Gly Gly Met Tyr Pro Arg Ser Asn
 45 100 105 110
 Trp Trp Tyr Asn Leu Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 115 120 125
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser

RU 2767209 C2

130 135 140
 Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 145 150 155 160
 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 5 165 170 175
 Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 180 185 190
 Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 195 200 205
 10 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 210 215 220
 Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Glu Val Lys Thr Asp Ser Thr
 225 230 235 240
 Asp His Val Lys Pro Lys Glu Thr Glu Asn Thr Lys Gln Pro Ser Lys
 15 245 250 255
 Ser Cys His Lys Pro Lys Ala Ile Val His Thr Glu Lys Val Asn Met
 260 265 270
 Met Ser Leu Thr Val Leu Gly Leu Arg Met Leu Phe Ala Lys Thr Val
 275 280 285
 20 Ala Val Asn Phe Leu Leu Thr Ala Lys Leu Phe Phe Leu
 290 295 300
 <210> 57
 <211> 108
 <212> PRT
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Домен IgVL антитела против CD19, клон 5
 <400> 57
 Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys
 30 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
 35 35 40 45
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp Tyr
 40 85 90 95
 Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105
 <210> 58
 <211> 130
 45 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Домен IgVH антитела против CD19, клон 5-9

<400> 58

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Phe Phe
 50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gln Val Trp Gly Trp Gln Gly Gly Met Tyr Pro Arg Ser Asn
 100 105 110

Trp Trp Tyr Asn Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 115 120 125

Ser Ser
 130

<210> 59

<211> 130

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен IgVH антитела против CD19, клон 5-13

<400> 59

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gln Val Trp Gly Trp Gln Gly Gly Met Tyr Pro Arg Ser Asn
 100 105 110

Trp Trp Tyr Asn Leu Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 115 120 125

Ser Ser
 130

<210> 60

<211> 101

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CH1 IgG2-0C

<400> 60

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 5 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 10 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 15 85 90 95
 Thr Val Glu Arg Lys
 100

<210> 61

<211> 102

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CH1 IgG2-1C

<400> 61

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 25 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 30 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 35 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Thr Val Glu Arg Lys Cys
 100

<210> 62

40 <211> 103

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CH1 IgG2-2C

45 <400> 62

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

RU 2767209 C2

20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 5 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 10 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys
 100
 <210> 63
 <211> 103
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> CH1 IgG3
 <400> 63
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 20 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 25 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 30 85 90 95
 Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro
 100
 <210> 64
 <211> 103
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> CH1 IgG4
 <400> 64
 40 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 45 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr

RU 2767209 C2

100 105

<210> 67
 <211> 159
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> CH1 IgD
 <400> 67

Ala Pro Thr Lys Ala Pro Asp Val Phe Pro Ile Ile Ser Gly Cys Arg
 10 1 5 10 15
 His Pro Lys Asp Asn Ser Pro Val Val Leu Ala Cys Leu Ile Thr Gly
 20 25 30
 Tyr His Pro Thr Ser Val Thr Val Thr Trp Tyr Met Gly Thr Gln Ser
 35 40 45
 15 Gln Pro Gln Arg Thr Phe Pro Glu Ile Gln Arg Arg Asp Ser Tyr Tyr
 50 55 60
 Met Thr Ser Ser Gln Leu Ser Thr Pro Leu Gln Gln Trp Arg Gln Gly
 65 70 75 80
 Glu Tyr Lys Cys Val Val Gln His Thr Ala Ser Lys Ser Lys Lys Glu
 20 85 90 95
 Ile Phe Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro
 100 105 110
 Thr Ala Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala
 115 120 125
 25 Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys
 130 135 140
 Glu Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro
 145 150 155

<210> 68
 30 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> CH1 IgE
 35 <400> 68

Ala Ser Thr Gln Ser Pro Ser Val Phe Pro Leu Thr Arg Cys Cys Lys
 1 5 10 15
 Asn Ile Pro Ser Asn Ala Thr Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Ala Thr
 20 25 30
 40 Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Met Val Thr Trp Asp Thr Gly Ser Leu
 35 40 45
 Asn Gly Thr Thr Met Thr Leu Pro Ala Thr Thr Leu Thr Leu Ser Gly
 50 55 60
 His Tyr Ala Thr Ile Ser Leu Leu Thr Val Ser Gly Ala Trp Ala Lys
 45 65 70 75 80
 Gln Met Phe Thr Cys Arg Val Ala His Thr Pro Ser Ser Thr Asp Trp
 85 90 95
 Val Asp Asn Lys Thr Phe Ser

100

<210> 69

<211> 104

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<223> CH1 IgM

<400> 69

10 Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn
 1 5 10 15
 Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp
 20 25 30
 Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Leu Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser
 35 40 45
 15 Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys
 50 55 60
 Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln
 65 70 75 80
 Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn
 20 85 90 95
 Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro

100

<210> 70

<211> 41

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Костимулирующий фрагмент CD28

<400> 70

30 Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
 1 5 10 15
 Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 20 25 30
 Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 35 35 40

<210> 71

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40 <220>

<223> Костимулирующий фрагмент 4-1BB

<400> 71

45 Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 1 5 10 15
 Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 20 25 30
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
 35 40

<210> 72
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 5 <220>
 <223> Домен IgVH антитела против NY-ESO-1/HLA-A*02:01, клон 35
 <400> 72
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 10 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Asp Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ser Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Tyr
 15 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Leu Ser Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ser Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 20 Ala Arg Asp Trp Ser Tyr Ser Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 73
 25 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Домен IgVL антитела против NY-ESO-1/HLA-A*02:01, клон 35
 30 <400> 73
 Gln Ser Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30
 35 Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
 40 65 70 75 80
 Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
 85 90 95
 Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

45 <210> 74
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> линкер scFv
 <400> 74
 Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 5 1 5 10 15
 Ser Leu Glu Met Ala
 20
 <210> 75
 <211> 284
 10 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> анти-CD19-сTCR-дельта
 <400> 75
 15 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 20 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 25 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Val Trp Gly Trp Gln Gly Gly Met Tyr Pro Arg Ser Asn
 100 105 110
 Trp Trp Tyr Asn Leu Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 30 115 120 125
 Ser Ser Arg Ser Gln Pro His Thr Lys Pro Ser Val Phe Val Met Lys
 130 135 140
 Asn Gly Thr Asn Val Ala Cys Leu Val Lys Glu Phe Tyr Pro Lys Asp
 145 150 155 160
 35 Ile Arg Ile Asn Leu Val Ser Ser Lys Lys Ile Thr Glu Phe Asp Pro
 165 170 175
 Ala Ile Val Ile Ser Pro Ser Gly Lys Tyr Asn Ala Val Lys Leu Gly
 180 185 190
 Lys Tyr Glu Asp Ser Asn Ser Val Thr Cys Ser Val Gln His Asp Asn
 40 195 200 205
 Lys Thr Val His Ser Thr Asp Phe Glu Val Lys Thr Asp Ser Thr Asp
 210 215 220
 His Val Lys Pro Lys Glu Thr Glu Asn Thr Lys Gln Pro Ser Lys Ser
 225 230 235 240
 45 Cys His Lys Pro Lys Ala Ile Val His Thr Glu Lys Val Asn Met Met
 245 250 255
 Ser Leu Thr Val Leu Gly Leu Arg Met Leu Phe Ala Lys Thr Val Ala
 260 265 270

RU 2 767 209 C2

Val Asn Phe Leu Leu Thr Ala Lys Leu Phe Phe Leu
 275 280

<210> 76
 <211> 282
 5 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> анти-CD19-сTCR-гамма
 <400> 76

10 Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
 15 35 40 45
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80
 20 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp Tyr
 85 90 95
 Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Asp Lys Gln
 100 105 110
 Leu Asp Ala Asp Val Ser Pro Lys Pro Thr Ile Phe Leu Pro Ser Ile
 25 115 120 125
 Ala Glu Thr Lys Leu Gln Lys Ala Gly Thr Tyr Leu Cys Leu Leu Glu
 130 135 140
 Lys Phe Phe Pro Asp Val Ile Lys Ile His Trp Gln Glu Lys Lys Ser
 145 150 155 160
 30 Asn Thr Ile Leu Gly Ser Gln Glu Gly Asn Thr Met Lys Thr Asn Asp
 165 170 175
 Thr Tyr Met Lys Phe Ser Trp Leu Thr Val Pro Glu Lys Ser Leu Asp
 180 185 190
 Lys Glu His Arg Cys Ile Val Arg His Glu Asn Asn Lys Asn Gly Val
 35 195 200 205
 Asp Gln Glu Ile Ile Phe Pro Pro Ile Lys Thr Asp Val Ile Thr Met
 210 215 220
 Asp Pro Lys Asp Asn Cys Ser Lys Asp Ala Asn Asp Thr Leu Leu Leu
 225 230 235 240
 40 Gln Leu Thr Asn Thr Ser Ala Tyr Tyr Met Tyr Leu Leu Leu Leu Leu
 245 250 255
 Lys Ser Val Val Tyr Phe Ala Ile Ile Thr Cys Cys Leu Leu Arg Arg
 260 265 270
 Thr Ala Phe Cys Cys Asn Gly Glu Lys Ser
 45 275 280

<210> 77
 <211> 142
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Константный домен TCR-альфа

<400> 77

5 Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser
 1 5 10 15
 Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln
 20 25 30
 Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys
 10 35 40 45
 Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val
 50 55 60
 Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn
 65 70 75 80
 15 Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys
 85 90 95
 Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn
 100 105 110
 Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val
 20 115 120 125
 Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
 130 135 140

<210> 78

<211> 177

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Константный домен TCR-бета

<400> 78

30 Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro
 1 5 10 15
 Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
 20 25 30
 Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
 35 35 40 45
 Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys
 50 55 60
 Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu
 65 70 75 80
 40 Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys
 85 90 95
 Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp
 100 105 110
 Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg
 45 115 120 125
 Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser
 130 135 140
 Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala

RU 2767209 C2

Ser Leu Asp Lys Glu His Arg Cys Ile Val Arg His Glu Asn Asn Lys
85 90 95
Asn Gly Val Asp Gln Glu Ile Ile Phe Pro Pro Ile Lys Thr Asp Val
100 105 110
5 Ile Thr Met Asp Pro Lys Asp Asn Cys Ser Lys Asp Ala Asn Asp Thr
115 120 125
Leu Leu Leu Gln Leu Thr Asn Thr Ser Ala Tyr Tyr Met Tyr Leu Leu
130 135 140
Leu Leu Leu Lys Ser Val Val Tyr Phe Ala Ile Ile Thr Cys Cys Leu
10 145 150 155 160
Leu Arg Arg Thr Ala Phe Cys Cys Asn Gly Glu Lys Ser
165 170
<210> 81
<211> 271
15 <212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> abTCR-7-дельта против AFP158/HLA-A*02:01
<400> 81
20 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Pro Asn Tyr
20 25 30
Trp Ile Thr Trp Val Arg Gln Met Ser Gly Gly Gly Leu Glu Trp Met
25 35 40 45
Gly Arg Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Phe
50 55 60
Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ile Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
30 Leu His Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Tyr Tyr Val Ser Leu Val Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Arg Ser Gln Pro His Thr Lys Pro Ser Val Phe
35 115 120 125
Val Met Lys Asn Gly Thr Asn Val Ala Cys Leu Val Lys Glu Phe Tyr
130 135 140
Pro Lys Asp Ile Arg Ile Asn Leu Val Ser Ser Lys Lys Ile Thr Glu
145 150 155 160
40 Phe Asp Pro Ala Ile Val Ile Ser Pro Ser Gly Lys Tyr Asn Ala Val
165 170 175
Lys Leu Gly Lys Tyr Glu Asp Ser Asn Ser Val Thr Cys Ser Val Gln
180 185 190
His Asp Asn Lys Thr Val His Ser Thr Asp Phe Glu Val Lys Thr Asp
45 195 200 205
Ser Thr Asp His Val Lys Pro Lys Glu Thr Glu Asn Thr Lys Gln Pro
210 215 220
Ser Lys Ser Cys His Lys Pro Lys Ala Ile Val His Thr Glu Lys Val

(57) Формула изобретения

1. Химерная молекула (abTCR) антитело-Т-клеточный рецептор (TCR), специфически связывающая антиген-мишень, содержащий:

- 5 а) первую полипептидную цепь, содержащую первый антигенсвязывающий домен, содержащий домен V_H антитела, и первый домен Т-клеточного рецептора (TCRD), содержащий первый трансмембранный домен первой субъединицы TCR, необязательно, где первая полипептидная цепь дополнительно содержит:
- 10 (i) первый пептидный линкер между первым антигенсвязывающим доменом и первым TCRD;
- (ii) первый вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий костимулирующую внутриклеточную передающую сигналы последовательность с С-конца от первого трансмембранного домена; и/или
- (iii) первый сигнальный пептид с N-конца от первого антигенсвязывающего домена;
- 15 и
необязательно, где первый TCRD дополнительно содержит:
- (i) первый соединительный пептид или его фрагмент из субъединицы TCR с N-конца от первого трансмембранного домена; и/или
- (ii) первый внутриклеточный домен TCR, содержащий внутриклеточную
- 20 последовательность TCR с С-конца от первого трансмембранного домена; и
- б) вторую полипептидную цепь, содержащую второй антигенсвязывающий домен, содержащий домен V_L антитела, и второй TCRD, содержащий второй трансмембранный домен второй субъединицы TCR, необязательно, где вторая полипептидная цепь дополнительно содержит:
- 25 (i) второй пептидный линкер между вторым антигенсвязывающим доменом и вторым TCRD;
- (ii) второй вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий костимулирующую внутриклеточную передающую сигналы последовательность с С-конца от второго трансмембранного домена; и/или
- 30 (iii) второй сигнальный пептид с N-конца от второго антигенсвязывающего домена; и
и
необязательно, где второй TCRD дополнительно содержит:
- (i) второй соединительный пептид или его фрагмент из субъединицы TCR с N-конца от второго трансмембранного домена; и/или
- 35 (ii) второй внутриклеточный домен TCR, содержащий внутриклеточную последовательность TCR с С-конца от второго трансмембранного домена; и
где домен V_H первого антигенсвязывающего домена и домен V_L второго антигенсвязывающего домена формируют антигенсвязывающий модуль, специфически связывающий антиген-мишень, где
- 40 (i) первая субъединица TCR представляет собой цепь α TCR и вторая субъединица TCR представляет собой цепь β TCR;
- (ii) первая субъединица TCR представляет собой цепь β TCR и вторая субъединица TCR представляет собой цепь α TCR;
- (iii) первая субъединица TCR представляет собой цепь γ TCR и вторая субъединица
- 45 TCR представляет собой цепь δ TCR; или
- (iv) первая субъединица TCR представляет собой цепь δ TCR и вторая субъединица TCR представляет собой цепь γ TCR,
где первый TCRD и второй TCRD формируют модуль Т-клеточного рецептора

(TCRM), способный привлекать по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль, и

где антиген-мишень представляет собой комплекс, содержащий пептид и белок МНС.

2. abTCR по п. 1, где первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый пептидный линкер между первым антигенсвязывающим доменом и первым TCRD и вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй пептидный линкер между вторым антигенсвязывающим доменом и вторым TCRD.

3. abTCR по п. 2, где первый и/или второй пептидные линкеры содержат, индивидуально, константный домен или его фрагмент из иммуноглобулина или субъединицы T-клеточного рецептора.

4. abTCR по п. 3, где первый и/или второй пептидные линкеры содержат, индивидуально, домен CH1, CH2, CH3, CH4 или C_L антитела, или его фрагмент.

5. abTCR по п. 3, где первый и/или второй пептидные линкеры содержат, индивидуально, домен C_α, C_β, C_γ или C_δ TCR, или его фрагмент.

6. abTCR по любому из пп. 1-5, где первый TCRD дополнительно содержит первый соединительный пептид или его фрагмент из субъединицы TCR с N-конца от первого трансмембранного домена.

7. abTCR по любому из пп. 1-6, где второй TCRD дополнительно содержит второй соединительный пептид или его фрагмент из субъединицы TCR с N-конца от второго трансмембранного домена.

8. abTCR по п.6 или 7, где TCRM содержит дисульфидную связь между остатком в первом соединительном пептиде и остатком во втором соединительном пептиде.

9. abTCR по любому из пп. 1-8, где первый TCRD дополнительно содержит первый внутриклеточный домен TCR, содержащий внутриклеточную последовательность TCR с C-конца от первого трансмембранного домена.

10. abTCR по любому из пп. 1-9, где второй TCRD дополнительно содержит второй внутриклеточный домен TCR, содержащий внутриклеточную последовательность TCR с C-конца от второго трансмембранного домена.

11. abTCR по любому из пп. 1-10, где первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий костимулирующую внутриклеточную передающую сигналы последовательность с C-конца от первого трансмембранного домена.

12. abTCR по любому из пп. 1-11, где вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй вспомогательный внутриклеточный домен, содержащий костимулирующую внутриклеточную передающую сигналы последовательность с C-конца от второго трансмембранного домена.

13. abTCR по любому из пп. 1-12, где первая полипептидная цепь дополнительно содержит первый сигнальный пептид с N-конца от первого антигенсвязывающего домена.

14. abTCR по любому из пп. 1-13, где вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй сигнальный пептид с N-конца от второго антигенсвязывающего домена.

15. abTCR по любому из пп. 9-14, где пептид в комплексе антигена-мишени происходит из белка, выбранного из группы, состоящей из WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1 и PSA.

16. abTCR по любому из пп. 1-15, где молекула связывает антиген-мишень с равновесной константой диссоциации (K_d) от приблизительно 0,1 пМ до приблизительно 500 нМ.

17. abTCR по любому из пп. 1-16, где ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль выбран из группы, состоящей из CD3δε, CD3γϵ и ζζ.

18. abTCR по любому из пп. 1-17, где первая субъединица TCR представляет собой цепь α TCR и вторая субъединица TCR представляет собой цепь β TCR.

5 19. abTCR по любому из пп. 1-17, где первая субъединица TCR представляет собой цепь β TCR и вторая субъединица TCR представляет собой цепь α TCR.

20. abTCR по любому из пп. 1-17, где первая субъединица TCR представляет собой цепь γ TCR и вторая субъединица TCR представляет собой цепь δ TCR.

10 21. abTCR по любому из пп. 1-17, где первая субъединица TCR представляет собой цепь δ TCR и вторая субъединица TCR представляет собой цепь γ TCR.

22. Композиция для экспрессии abTCR по любому из пп. 1-21, где композиция содержит одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих первую и вторую полипептидные цепи abTCR по любому из пп. 1-21.

15 23. Комплекс abTCR для связывания комплекса пептида и белка МНС, где комплекс abTCR содержит abTCR по любому из пп. 1-21 и по меньшей мере один ассоциированный с TCR передающий сигналы модуль, выбранный из группы, состоящей из CD3δε, CD3γϵ и ζζ.

24. Комплекс по п. 23, где комплекс представляет собой октамер, содержащий abTCR и CD3δε, CD3γϵ и ζζ.

20 25. Эффекторная клетка для уничтожения клетки-мишени, представляющей антиген-мишень, представляющая на своей поверхности abTCR по любому из пп. 1-21 или комплекс по п. 23 или 24.

26. Эффекторная клетка для уничтожения клетки-мишени, представляющей антиген-мишень, содержащая одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих первую и
25 вторую полипептидные цепи abTCR по любому из пп. 1-21.

27. Эффекторная клетка по п. 25 или 26, где эффекторная клетка не экспрессирует первую субъединицу TCR и/или вторую субъединицу TCR.

28. Эффекторная клетка по п. 27, где

30 а) первая субъединица TCR представляет собой TCRα и вторая субъединица TCR представляет собой TCRβ; или

б) первая субъединица TCR представляет собой TCRβ и вторая субъединица TCR представляет собой TCRα; и

где эффекторная клетка представляет собой γδ Т-клетку.

29. Эффекторная клетка по п. 27, где

35 а) первая субъединица TCR представляет собой TCRγ и вторая субъединица TCR представляет собой TCRδ; или

б) первая субъединица TCR представляет собой TCRδ и вторая субъединица TCR представляет собой TCRγ; и

где эффекторная клетка представляет собой αβ Т-клетку.

40 30. Эффекторная клетка по любому из пп. 25-29, где эффекторную клетку модифицируют для блокирования или уменьшения экспрессии первой субъединицы эндогенного TCR и/или второй субъединицы эндогенного TCR.

31. Эффекторная клетка по п. 30, где

45 а) первая субъединица TCR представляет собой TCRα и вторая субъединица TCR представляет собой TCRβ; или

б) первая субъединица TCR представляет собой TCRβ и вторая субъединица TCR представляет собой TCRα; и

где эффекторная клетка представляет собой αβ Т-клетку, модифицированную для

блокирования или уменьшения экспрессии TCR α и/или TCR β .

32. Эффекторная клетка по п. 30, где

а) первая субъединица TCR представляет собой TCR γ и вторая субъединица TCR представляет собой TCR δ ; или

5 б) первая субъединица TCR представляет собой TCR δ и вторая субъединица TCR представляет собой TCR γ ; и

где эффекторная клетка представляет собой $\gamma\delta$ Т-клетку, модифицированную для блокирования или уменьшения экспрессии TCR γ и/или TCR δ .

10 33. Эффекторная клетка по любому из пп. 25-32, где эффекторная клетка представляет собой CD3⁺ клетку.

34. Эффекторная клетка по п. 33, где CD3⁺ клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксической Т-клетки, Т-клетки-помощника, Т-клетки - естественного киллера и супрессорной Т-клетки.

15 35. Эффекторная клетка по любому из пп. 25-34, содержащая а) первый вектор, содержащий первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первую полипептидную цепь abTCR под контролем первого промотора, и б) второй вектор, содержащий вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вторую полипептидную цепь abTCR под контролем второго промотора.

20 36. Эффекторная клетка по любому из пп. 25-34, содержащая вектор, содержащий а) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первую полипептидную цепь abTCR под контролем первого промотора, и б) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вторую полипептидную цепь abTCR под контролем второго промотора.

25 37. Эффекторная клетка по любому из пп. 25-34, содержащая вектор, содержащий а) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первую полипептидную цепь abTCR, и б) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вторую полипептидную цепь abTCR, где первая и вторая последовательности нуклеиновой кислоты находятся под контролем одного промотора.

30 38. Эффекторная клетка по любому из пп. 25-36, где экспрессия первой полипептидной цепи abTCR более чем в два раза отличается от экспрессии второй полипептидной цепи abTCR.

35 39. Способ уничтожения клетки-мишени, представляющей антиген-мишень, включающий приведение клетки-мишени в контакт с эффекторной клеткой по любому из пп. 25-38, где abTCR специфически связывает антиген-мишень и где антиген-мишень представляет собой комплекс, содержащий пептид и белок МНС.

40 40. Способ по п. 39, где контакт происходит *in vivo*.

41. Способ по п. 39, где контакт происходит *in vitro*.

42. Фармацевтическая композиция для лечения ассоциированного с антигеном-мишенью заболевания у нуждающегося в этом индивидуума, содержащая эффективное количество: abTCR по любому из пп. 1-21, одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих первую или вторую полипептидные цепи abTCR по любому из пп. 1-21, или эффекторную клетку по любому из пп. 25-38 и фармацевтически приемлемый носитель.

45 43. Способ лечения ассоциированного с антигеном-мишенью заболевания у нуждающегося в этом индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции по п. 42.

44. Способ по п. 43, где ассоциированное с антигеном-мишенью заболевание представляет собой злокачественную опухоль.

45. Способ по п. 44, где злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из адренокортикальной карциномы, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака шейки матки, холангиокарциномы, колоректального рака, рака пищевода, глиобластомы, глиомы, печеночно-клеточной карциномы, рака головы и шеи, рака
5 почки, лейкоза, лимфомы, рака легкого, меланомы, мезотелиомы, множественной миеломы, рака поджелудочной железы, феохромоцитомы, плазмацитомы, нейробластомы, рака яичника, рака предстательной железы, саркомы, рака желудка, рака тела матки и рака щитовидной железы.

46. Способ по п. 43, где ассоциированное с антигеном-мишенью заболевание
10 представляет собой вирусную инфекцию.

47. Способ по п. 46, где вирусная инфекция вызвана вирусом, выбранным из группы, состоящей из цитомегаловируса (CMV), вируса Эпштейна-Барр (EBV), вируса гепатита В (HBV), ассоциированного с саркомой Капоши вируса герпеса (KSHV), вируса папилломы человека (HPV), вируса контагиозного моллюска (MCV), вируса 1 Т-
15 клеточного лейкоза человека (HTLV-1), HIV (вируса иммунодефицита человека) и вируса гепатита С (HCV).

20

25

30

35

40

45

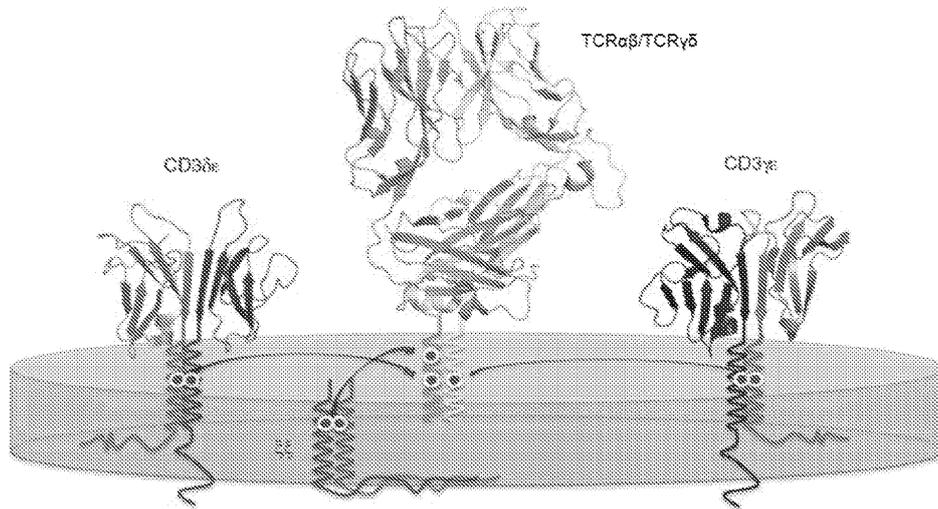
ФИГ. 1А

abTCR-3	abTCR-4	abTCR-5	abTCR-6
TCRα TCRβ	TCRα TCRβ	TCRδ TCRγ	TCRδ TCRγ

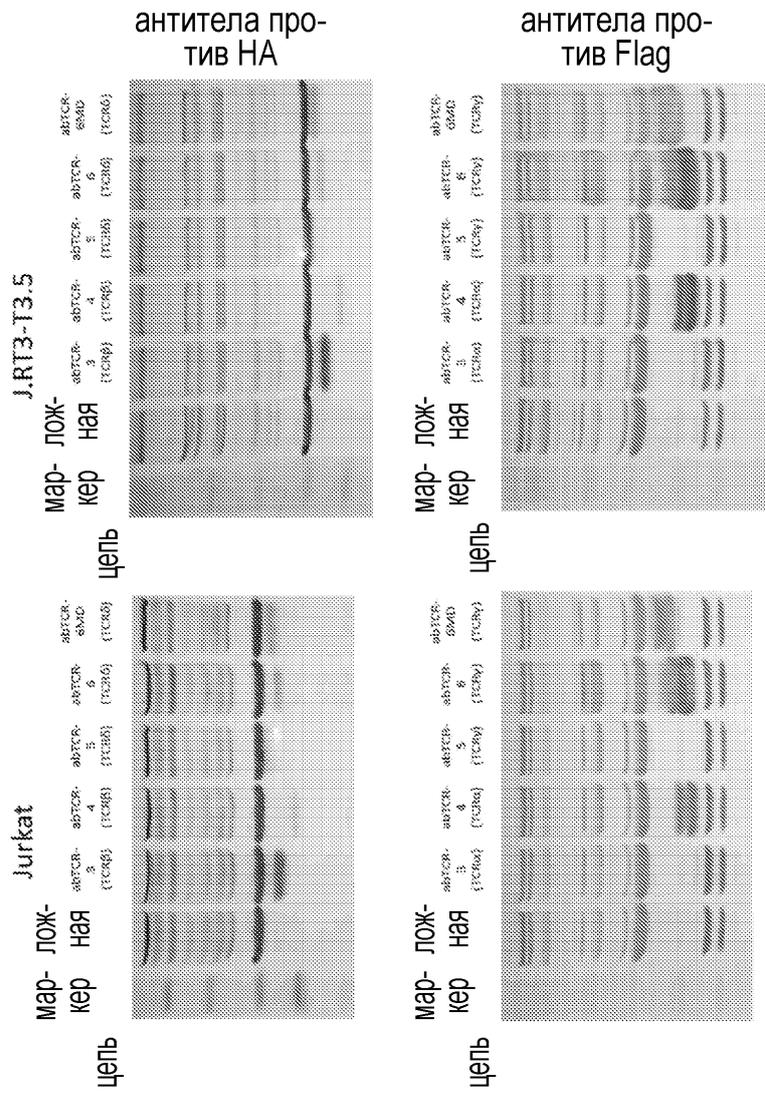
ФИГ. 1В

<p>Дополнительный линкер для увеличения, или делеция для уменьшения расстояния между ТМ и IgC</p>	<p>Дополнительный внутриклеточный эффекторный домен(ы)</p>	<p>Модификация линкера или дополнительные остатки для увеличения расстояния между доменами Ig</p>	<p>Любая комбинация или пермутации вариантов</p>
TCRα/δ β/γ	TCRα/δ β/γ	TCRα/δ β/γ	TCRα/δ β/γ

ФИГ. 2



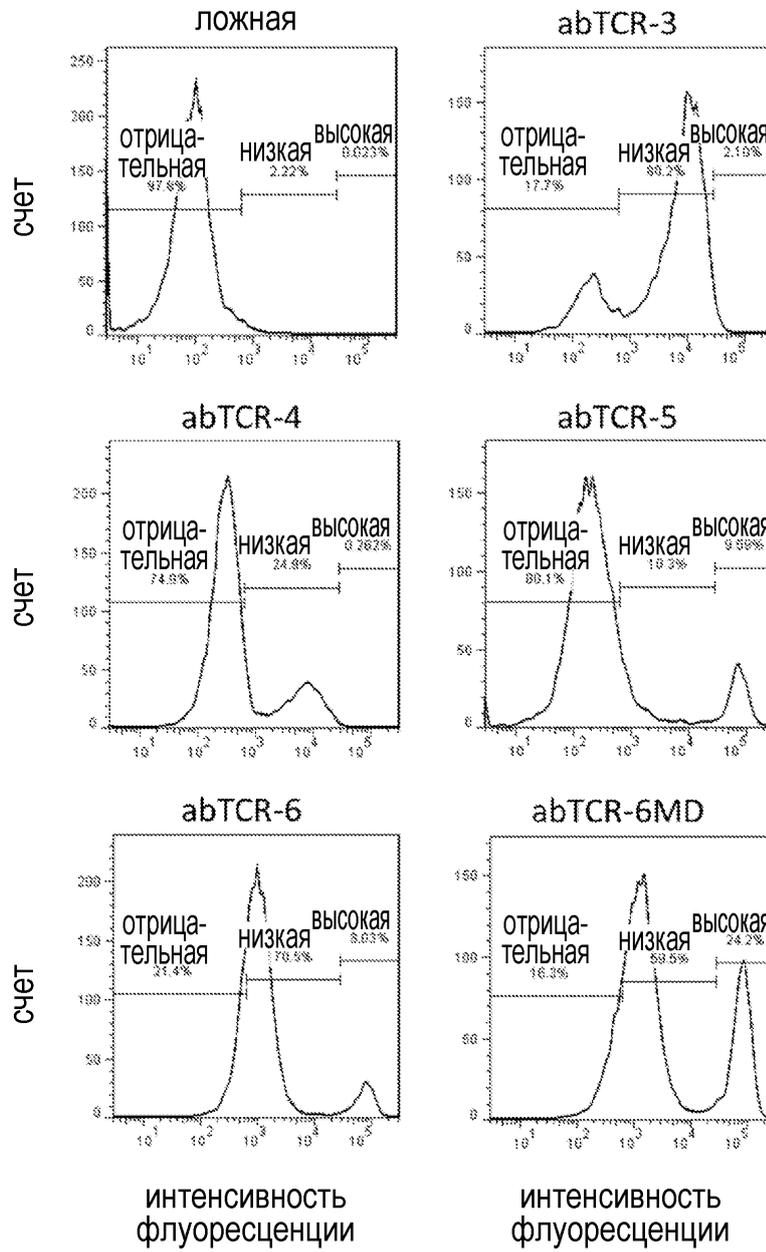
ФИГ. 3



4/54

ФИГ. 4А

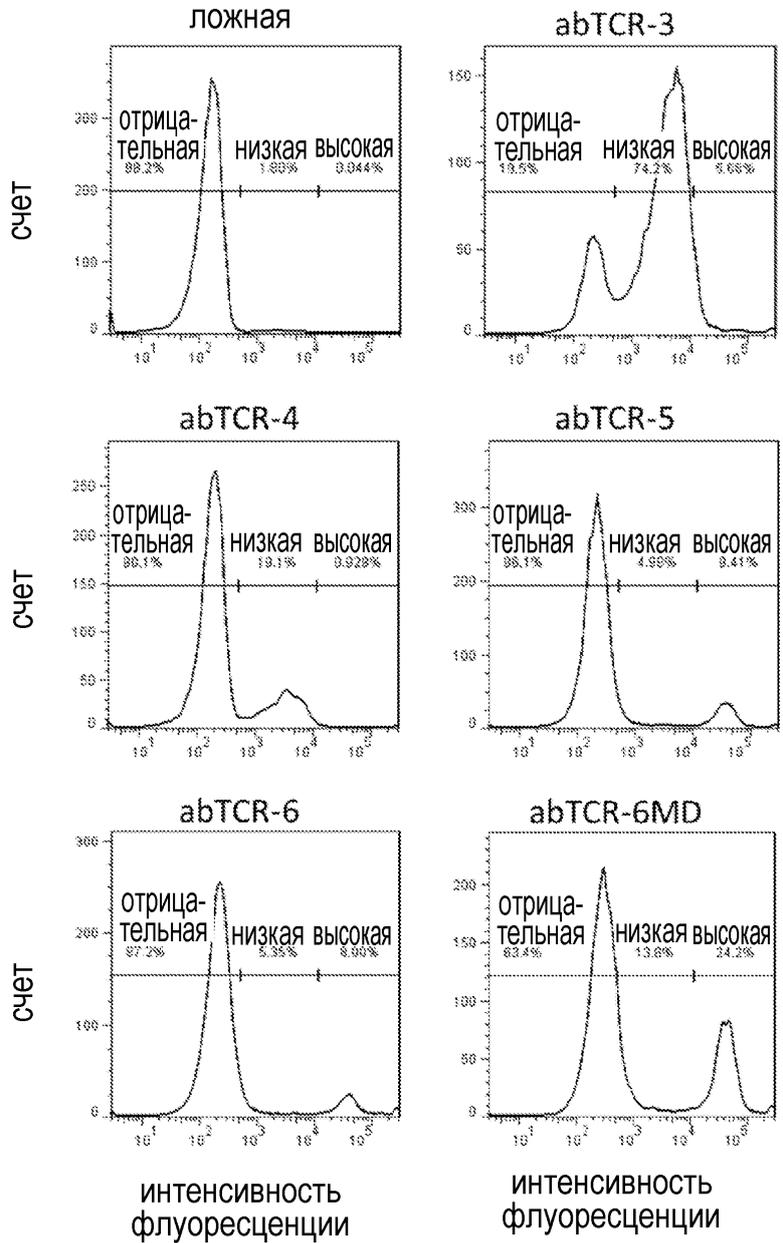
экспрессия CD3ε



5/54

ФИГ. 4В

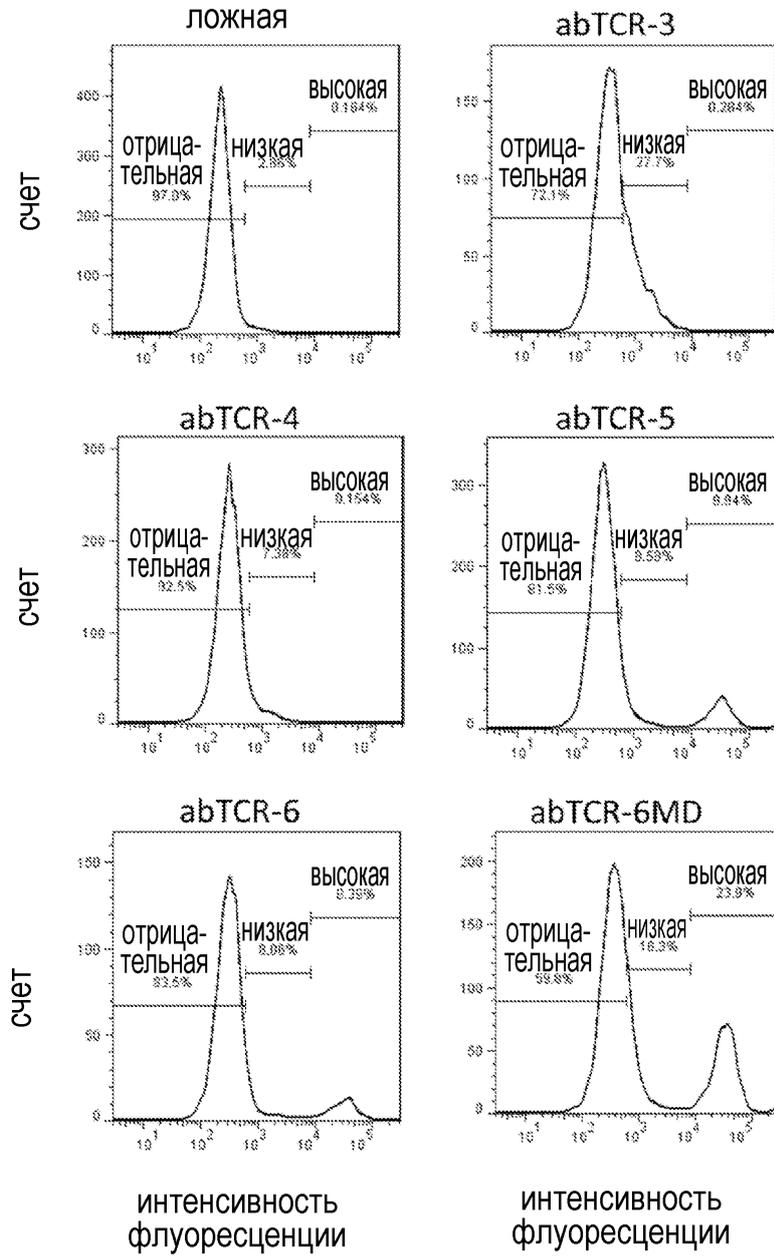
Связывание тетрамера AFP158/HLA



6/54

ФИГ. 4С

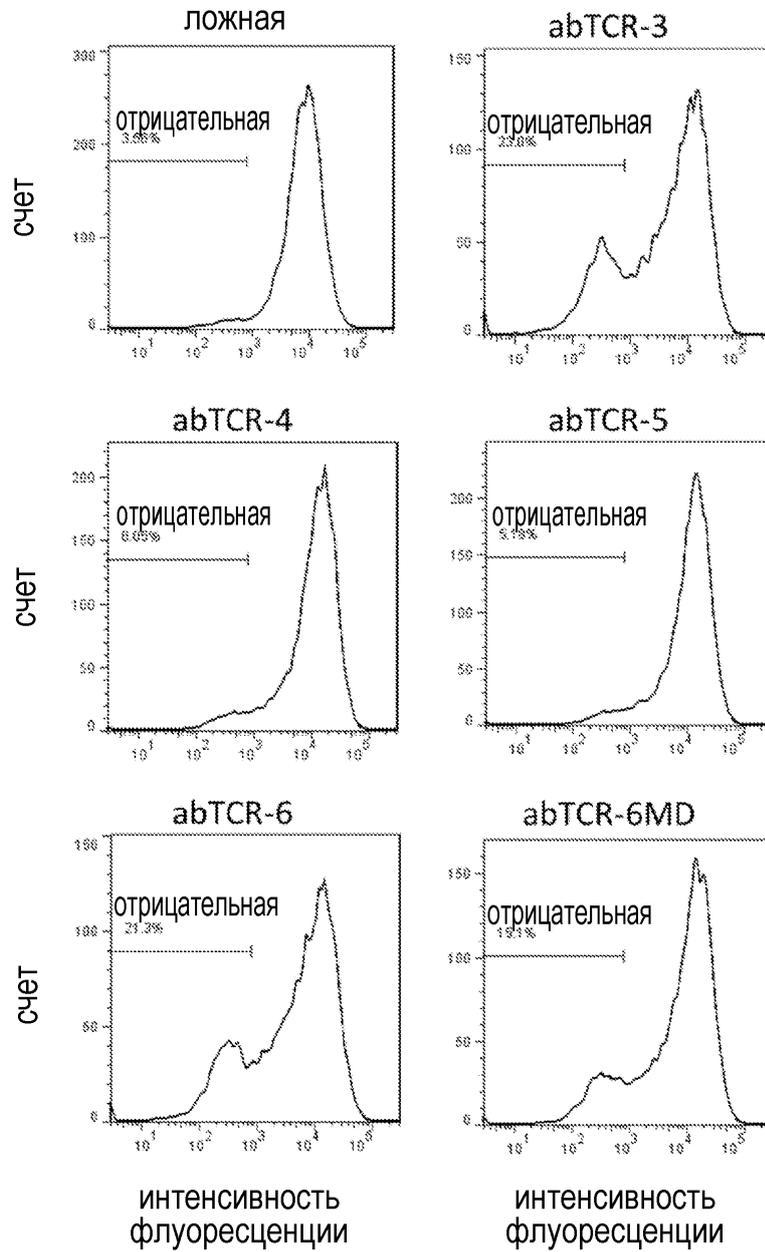
антиидиотипическое антитело



7/54

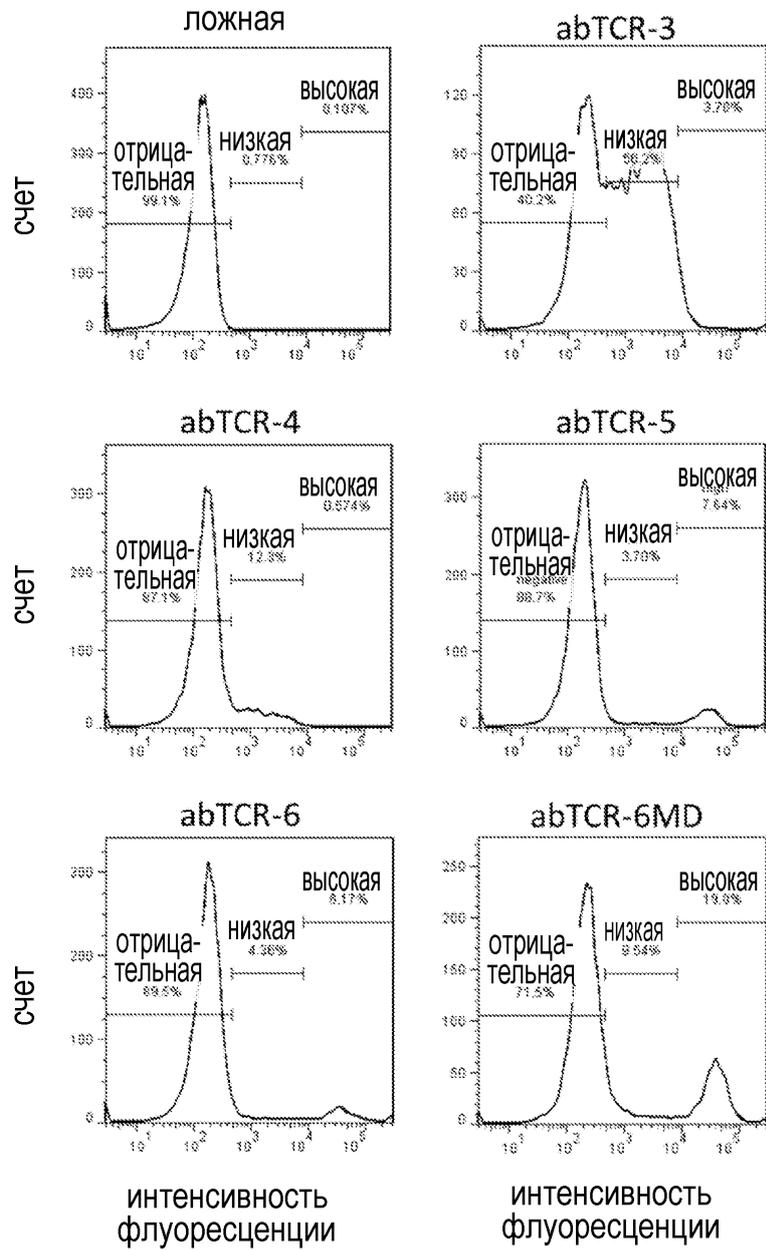
ФИГ. 5А

экспрессия TCR α/β



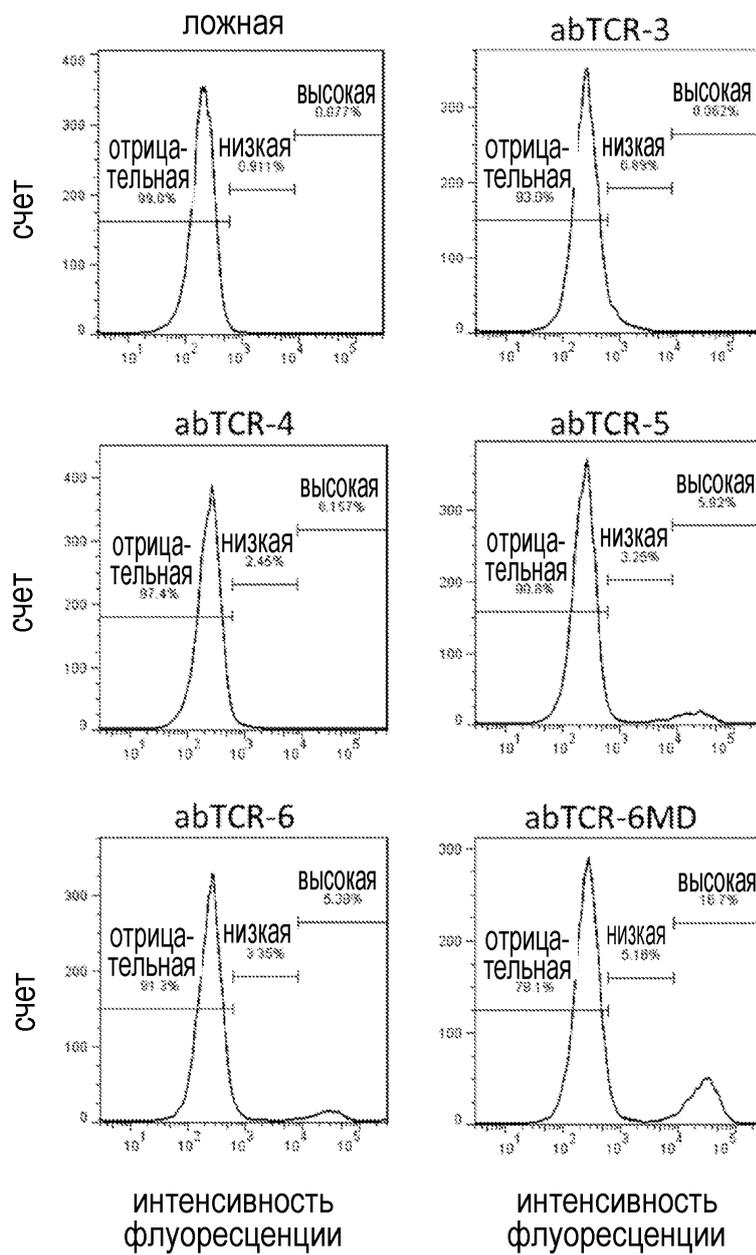
ФИГ. 5В

Связывание тетрамера AFP158/HLA



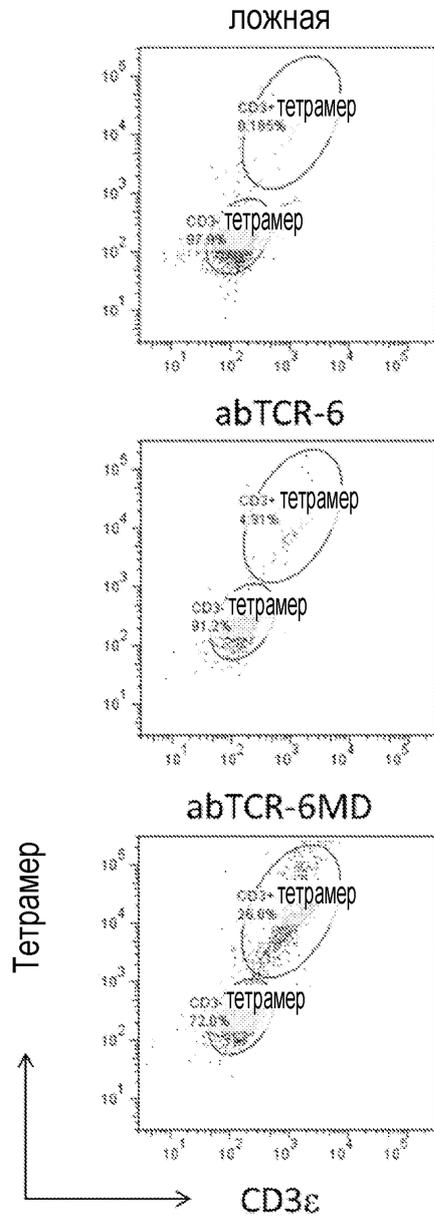
ФИГ. 5С

антиидиотипическое антитело



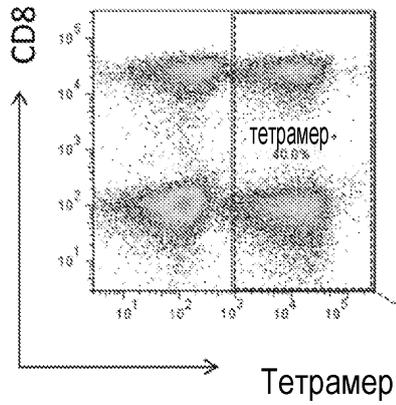
10/54

ФИГ. 6

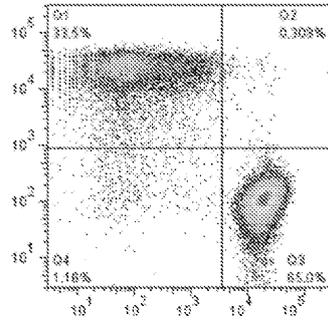


11/54

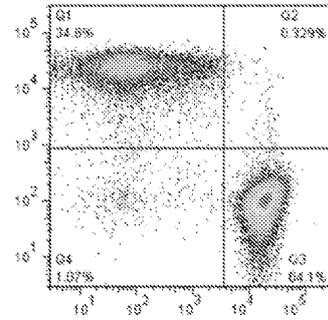
ФИГ. 7А



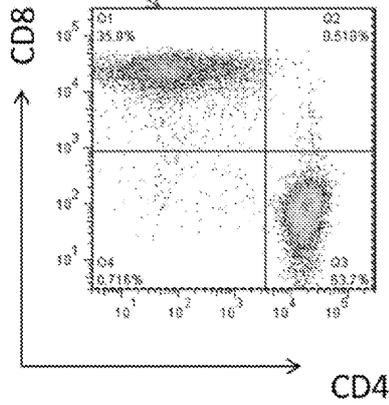
ФИГ. 7В



ЛОЖНАЯ



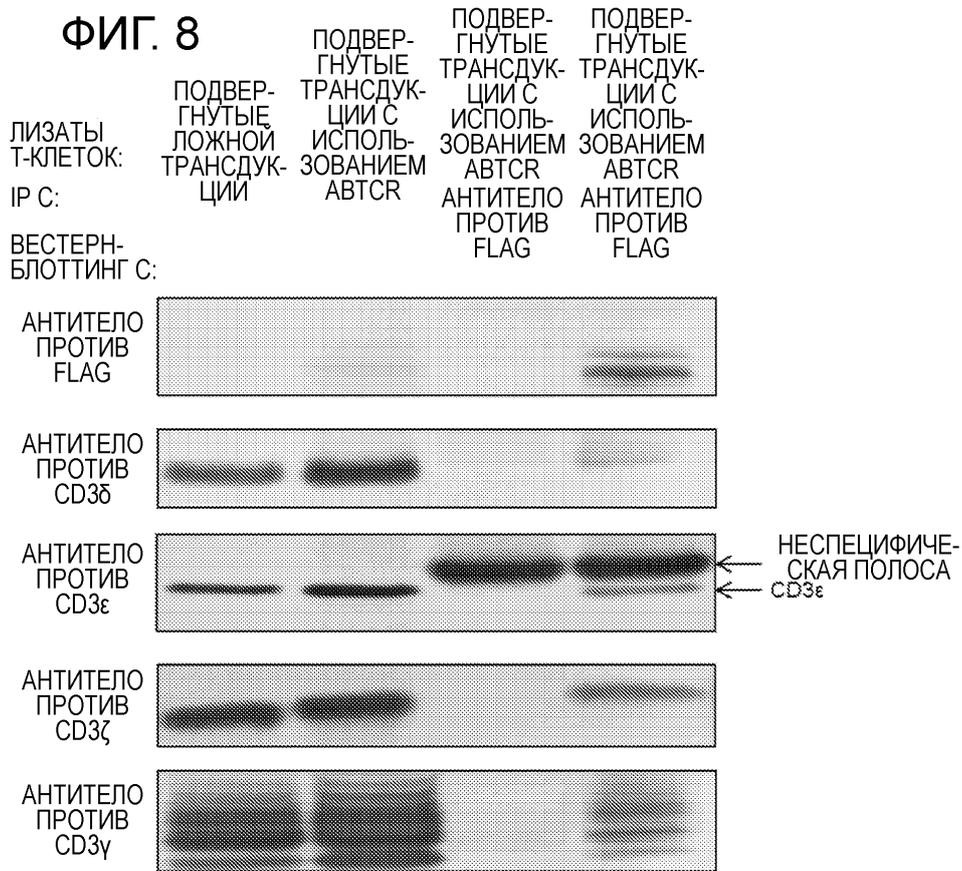
абТСР-6МД



абТСР-6МД, Тетрамер⁺

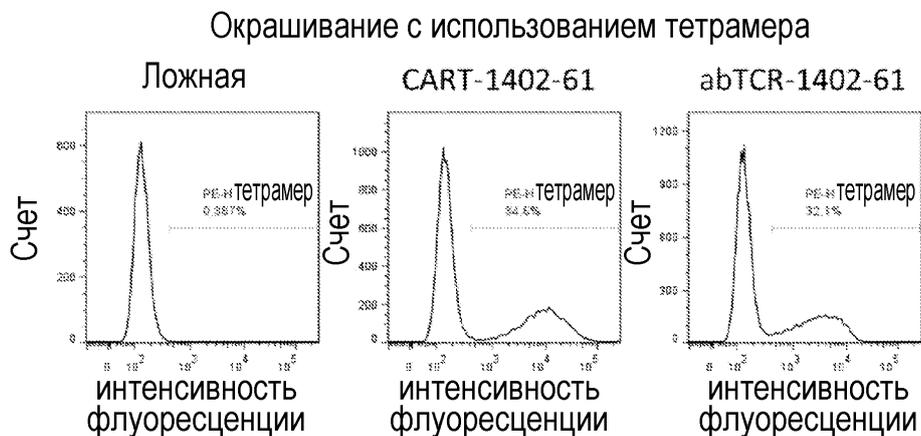
12/54

ФИГ. 8

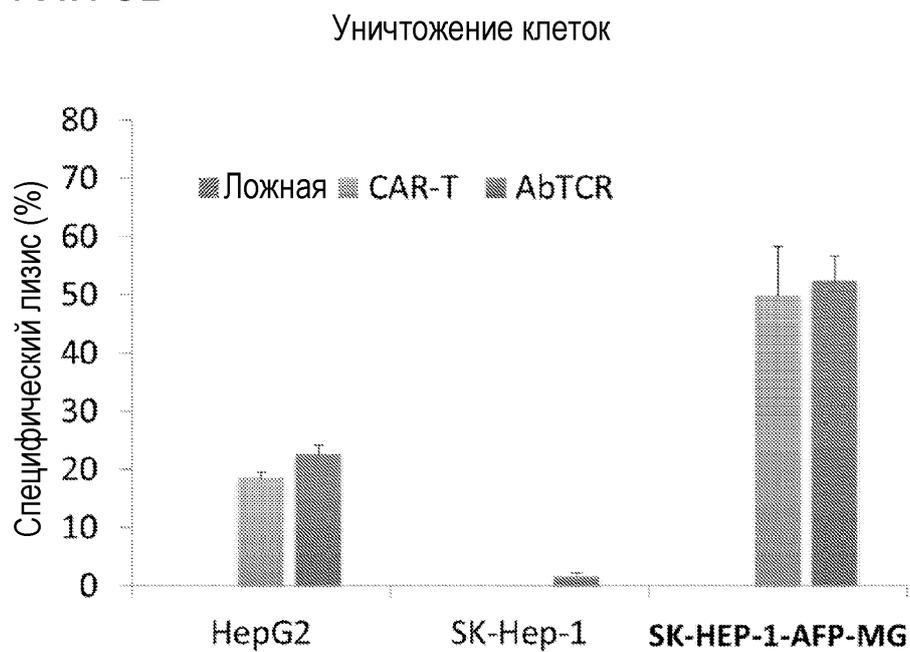


13/54

ФИГ. 9А

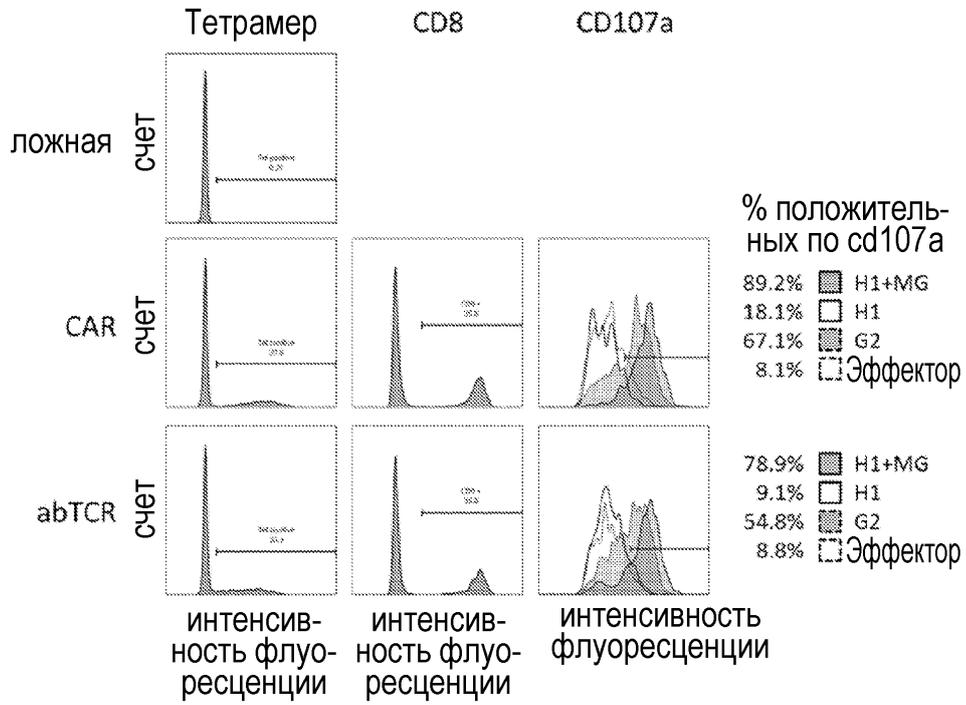


ФИГ. 9В



14/54

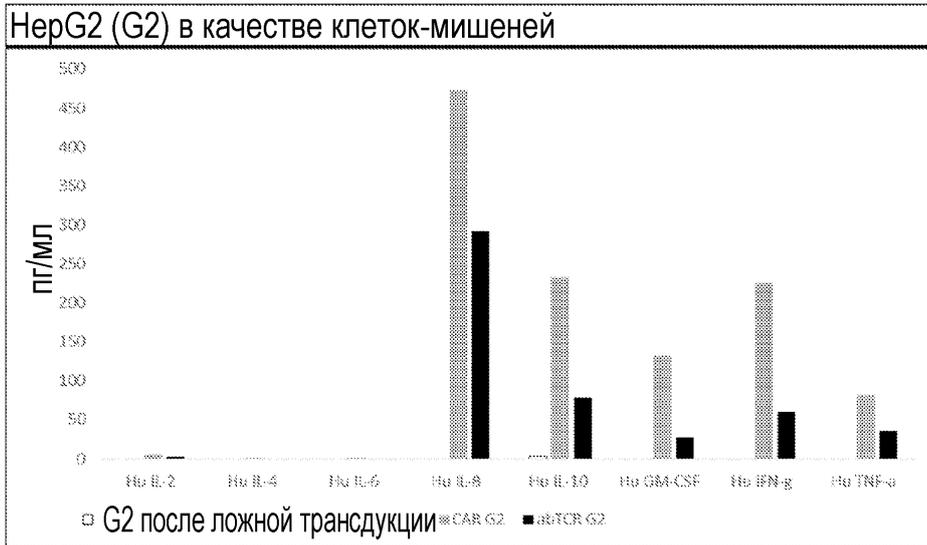
ФИГ. 10



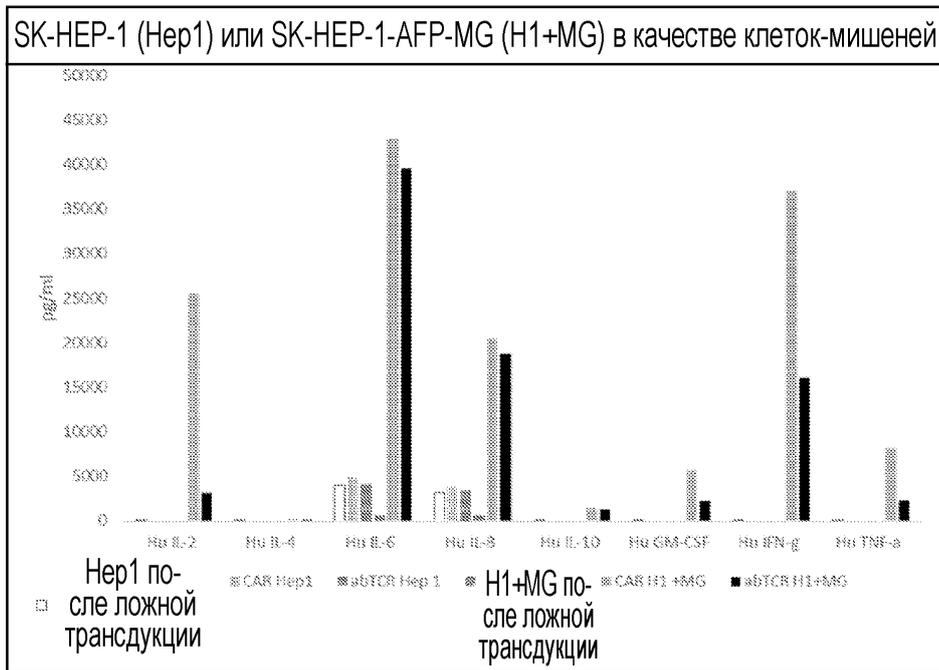
Условные обозначения	Клетки-мишени
H1+MG	SK-HEP-1-AFP-MG
H1	SK-HEP-1
G2	HepG2
Эффектор	-

15/54

ФИГ. 11А

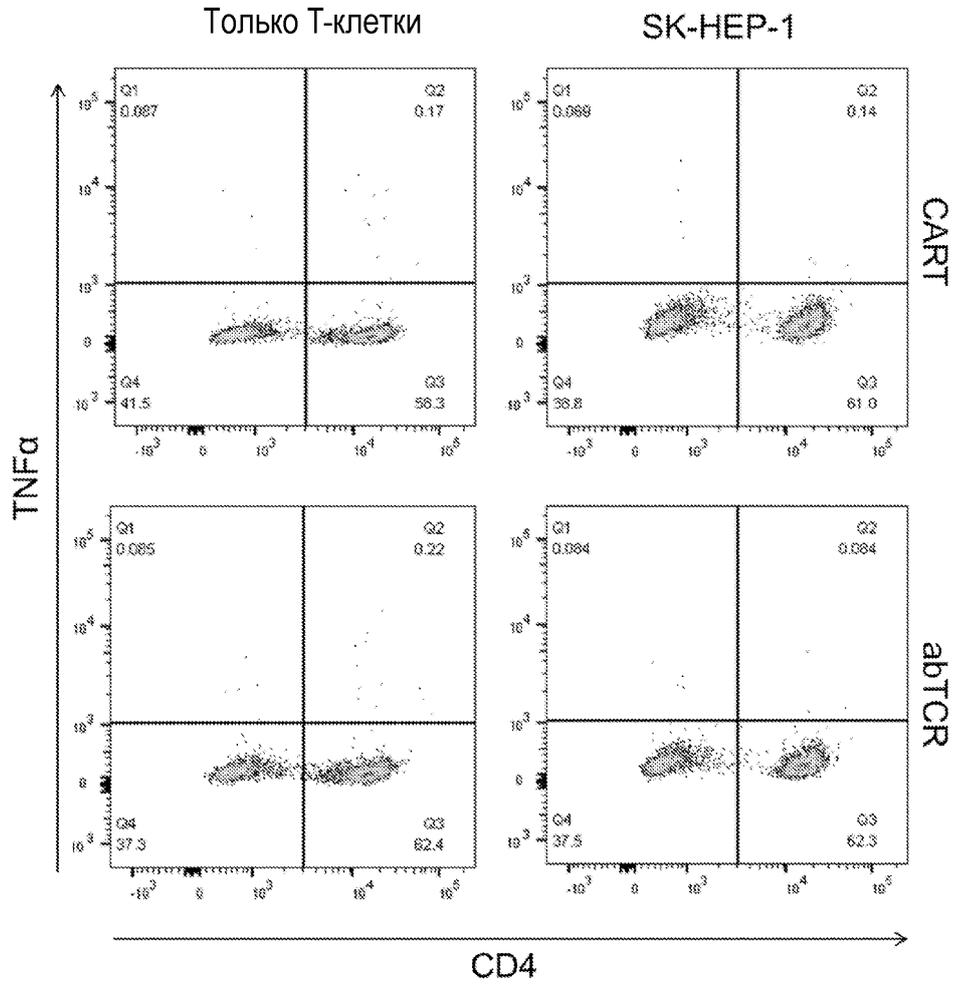


ФИГ. 11В



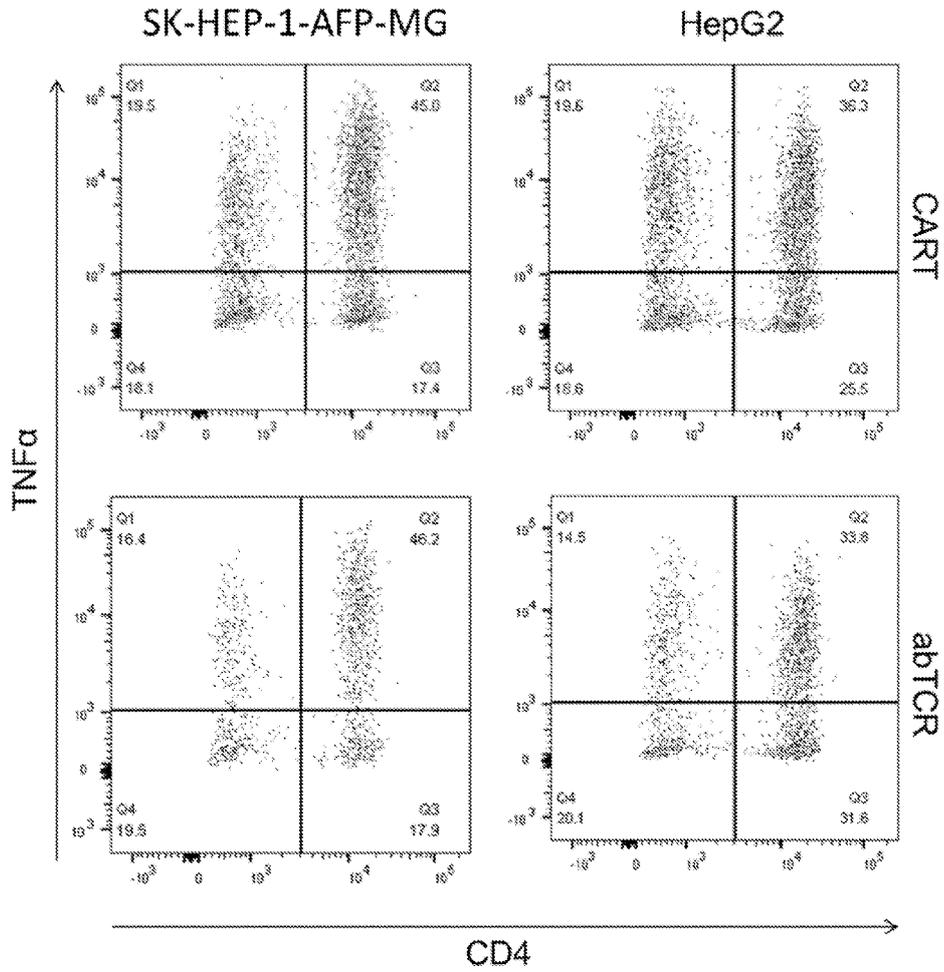
16/54

ФИГ. 12А



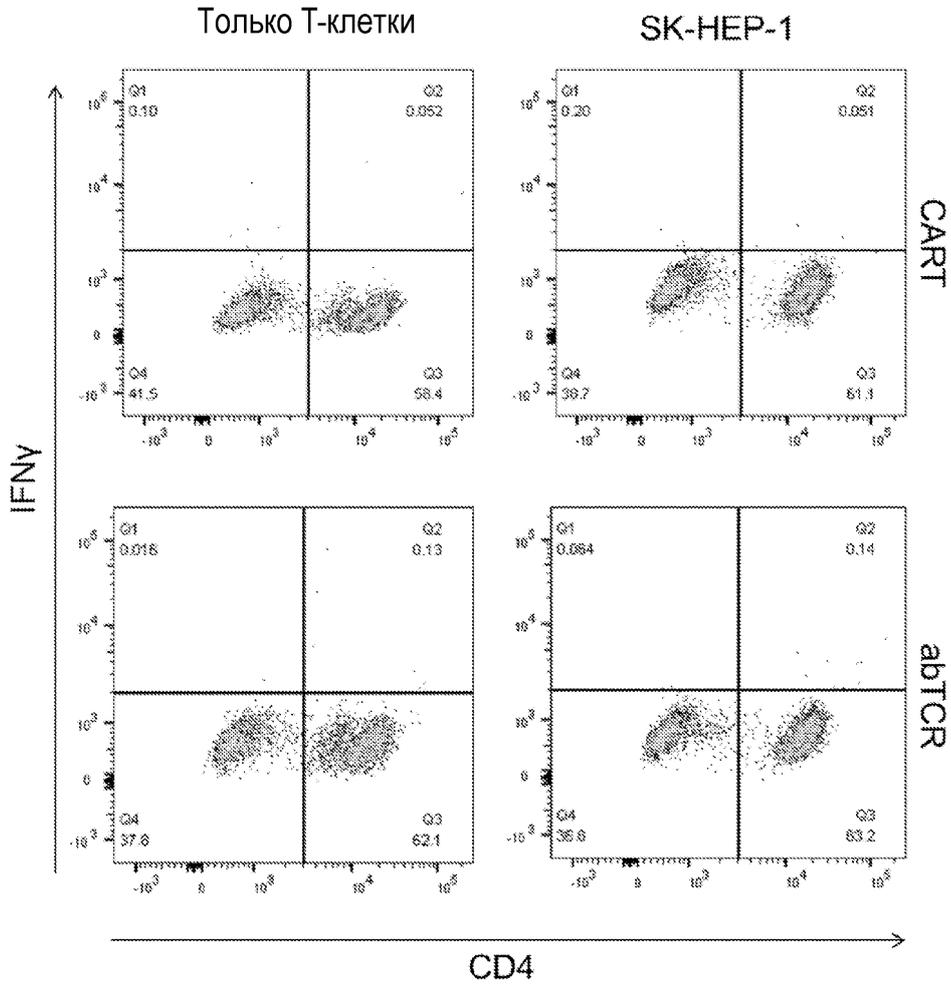
17/54

ФИГ. 12В



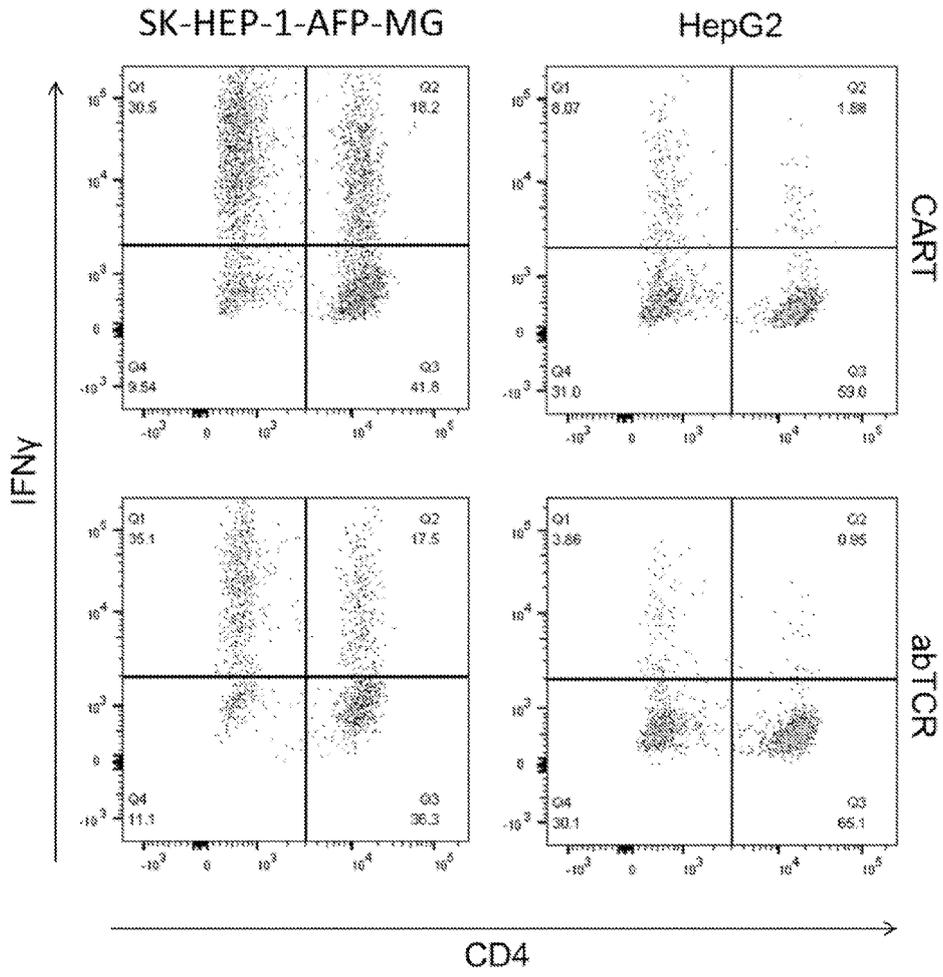
18/54

ФИГ. 12С



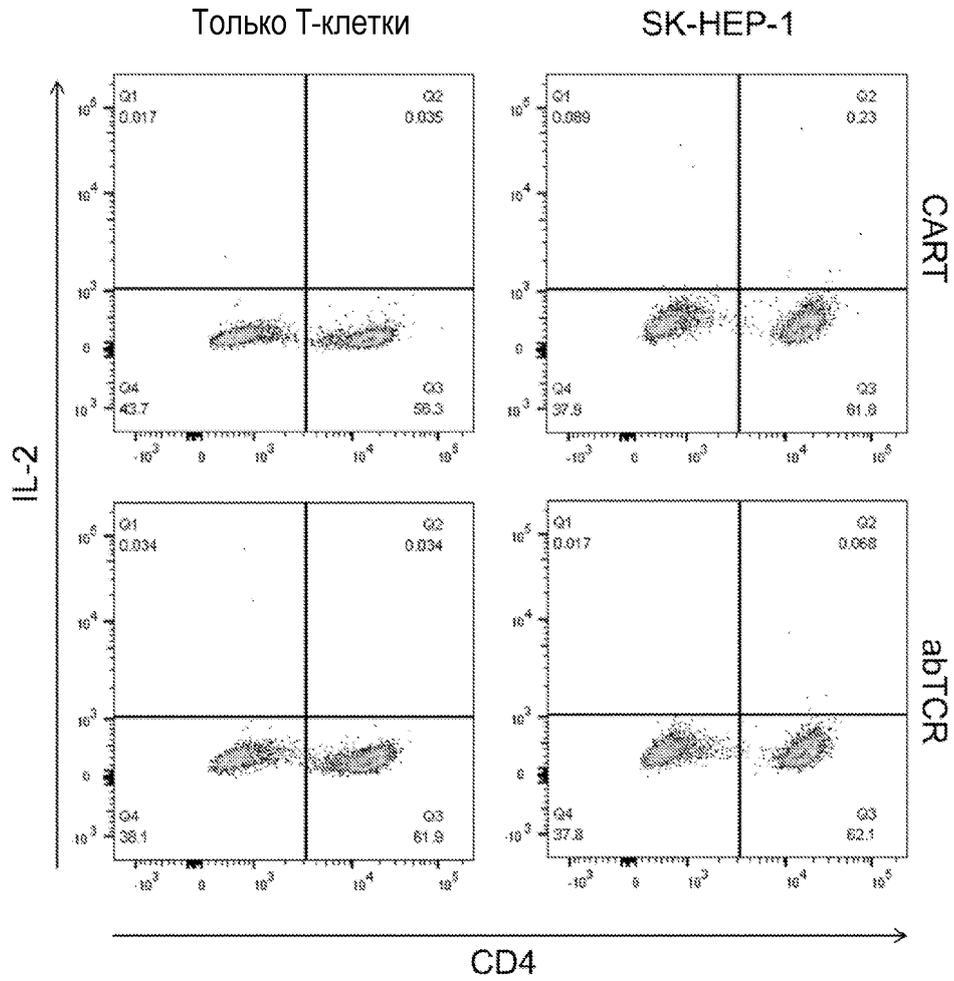
19/54

ФИГ. 12D



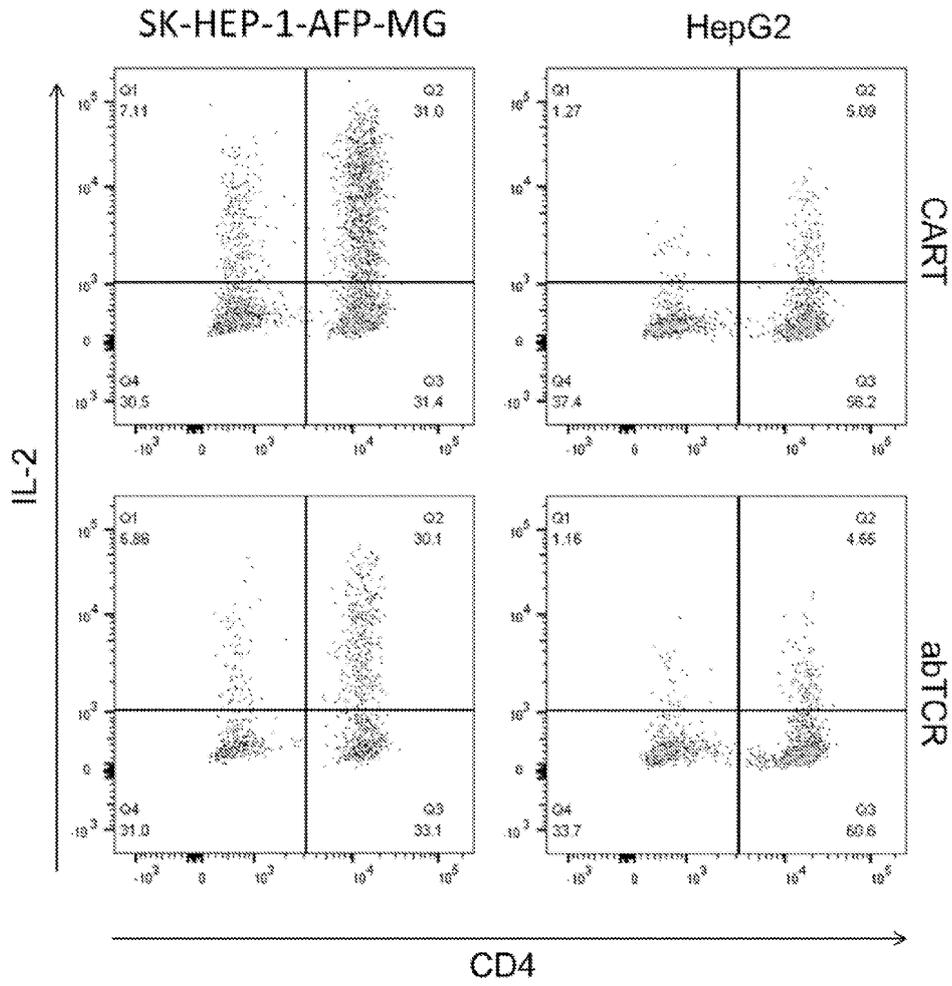
20/54

ФИГ. 12Е



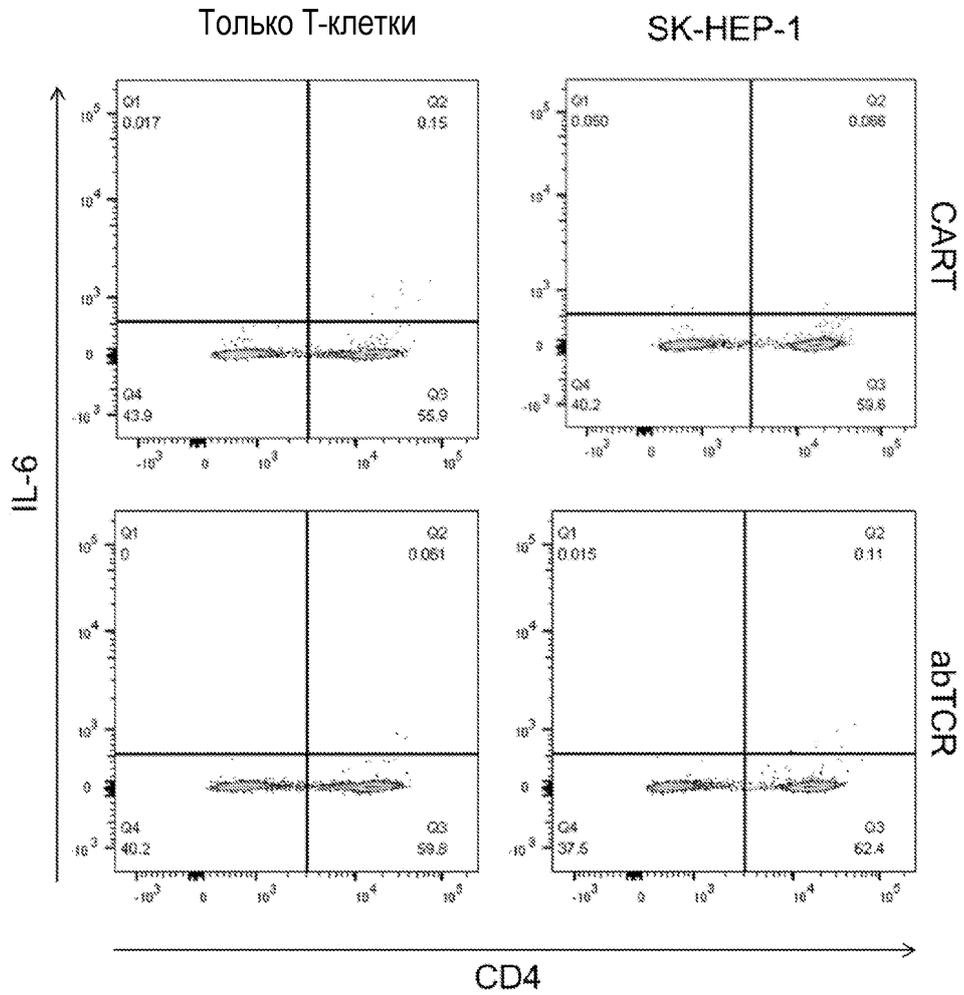
21/54

ФИГ. 12F



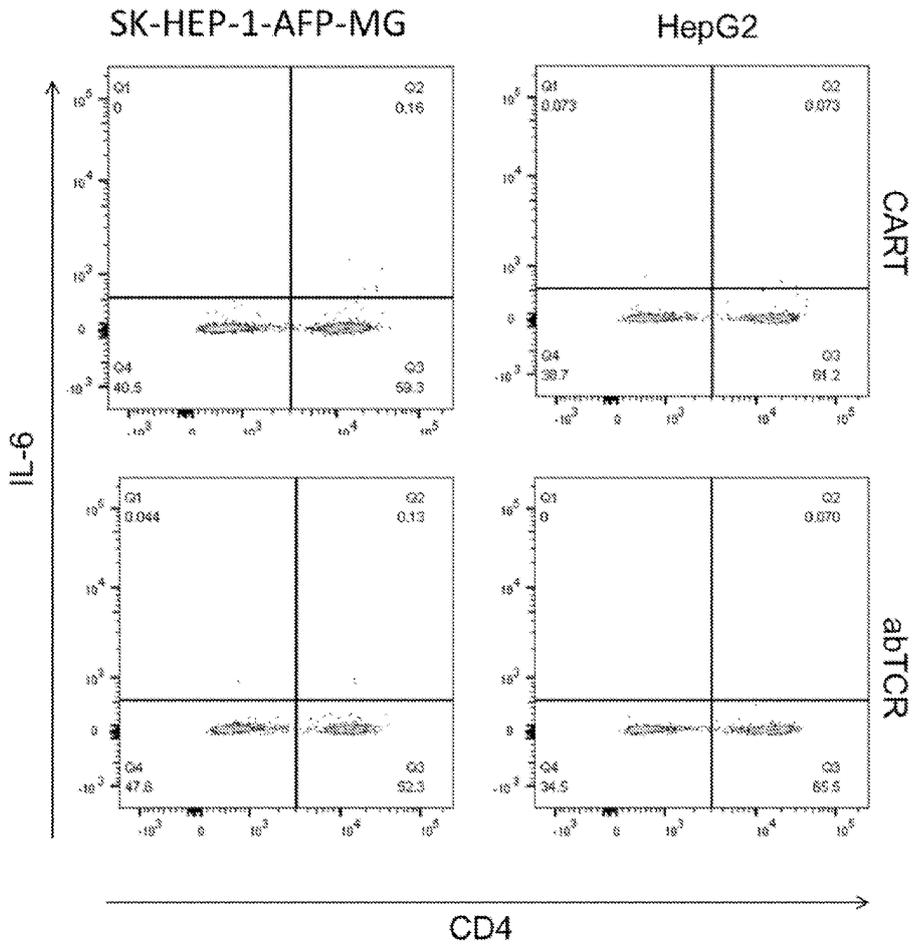
22/54

ФИГ. 12G



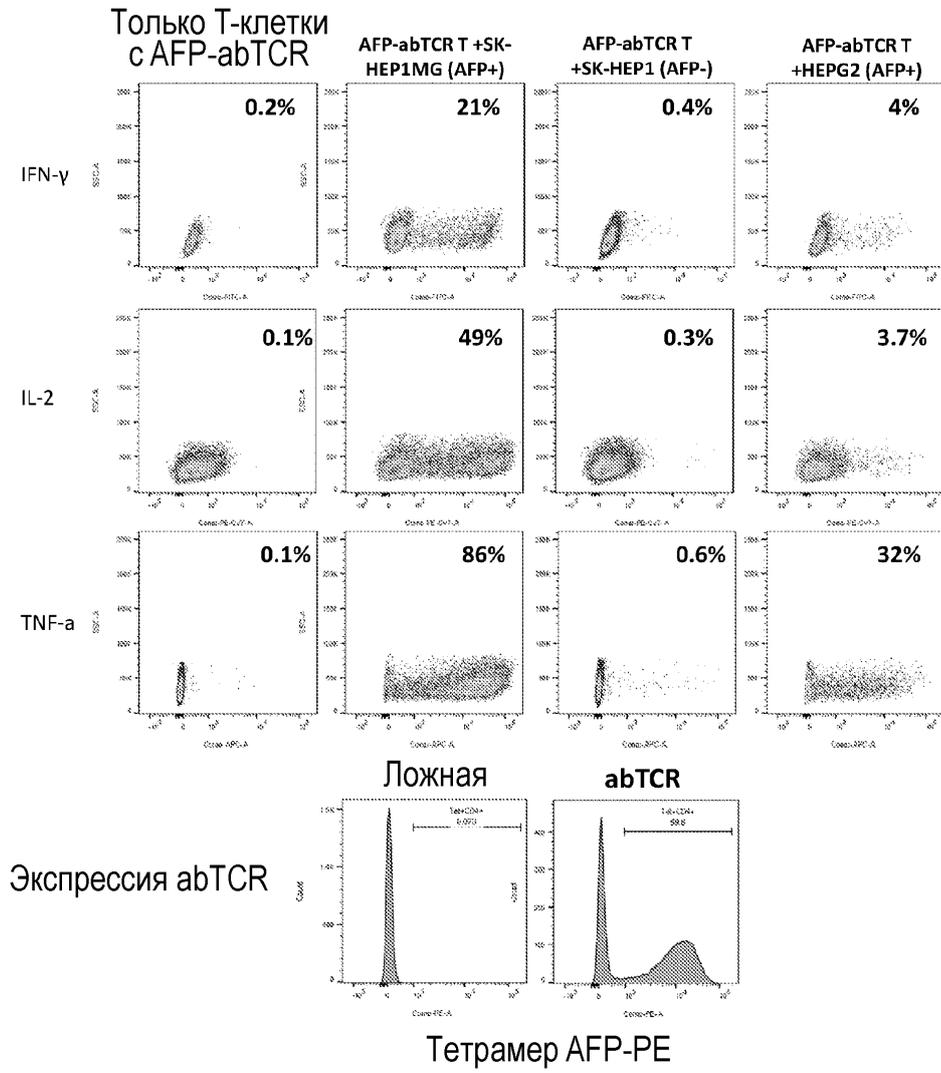
23/54

ФИГ. 12Н



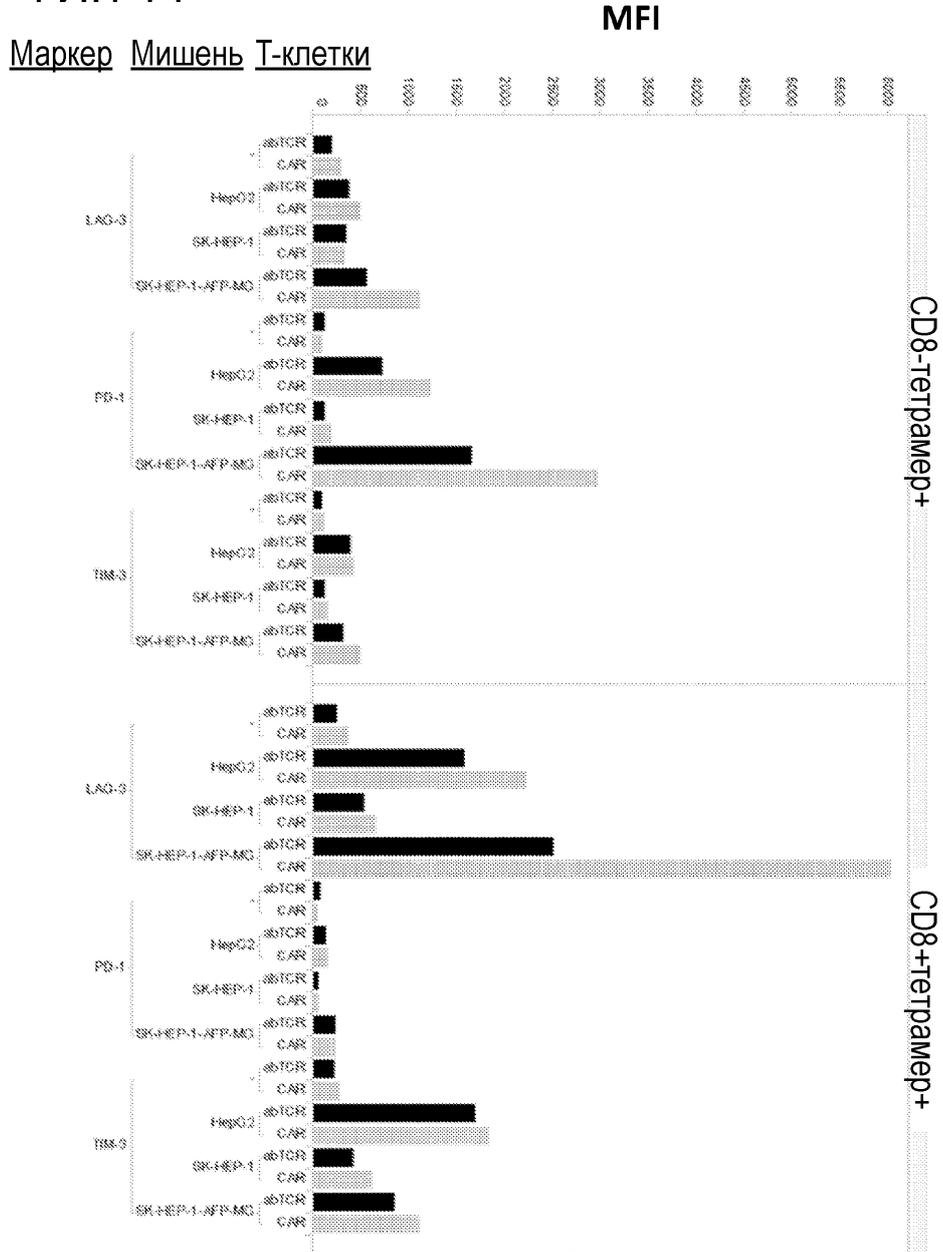
24/54

ФИГ. 13



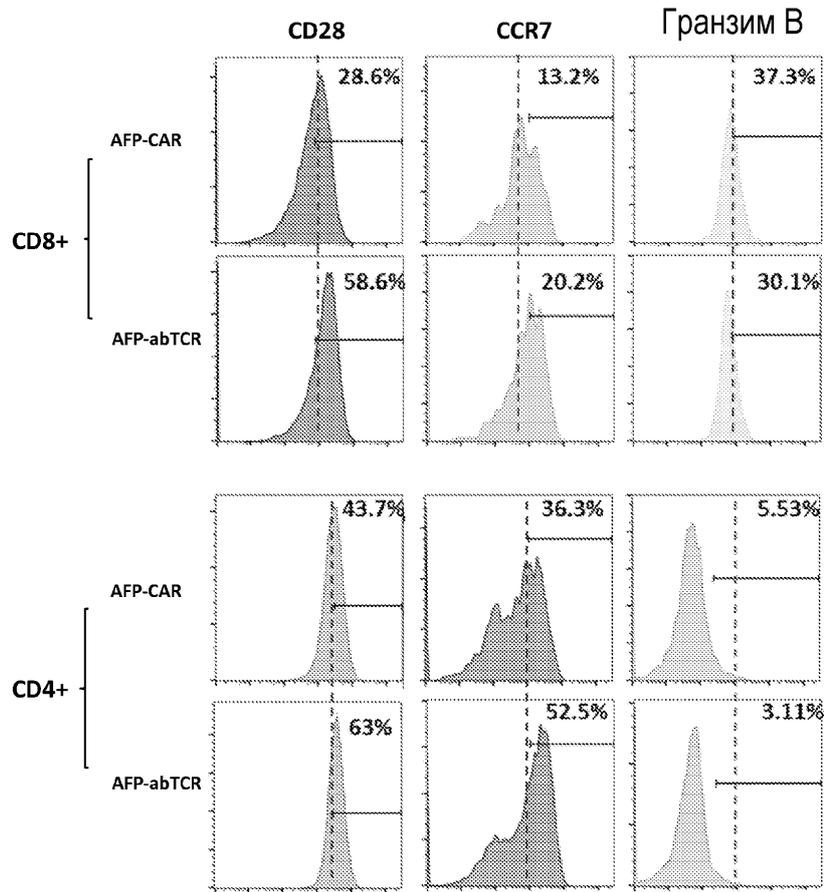
25/54

ФИГ. 14



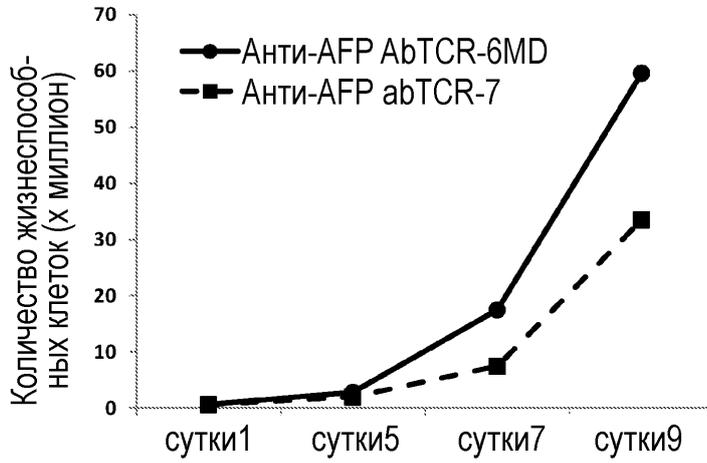
26/54

ФИГ. 15

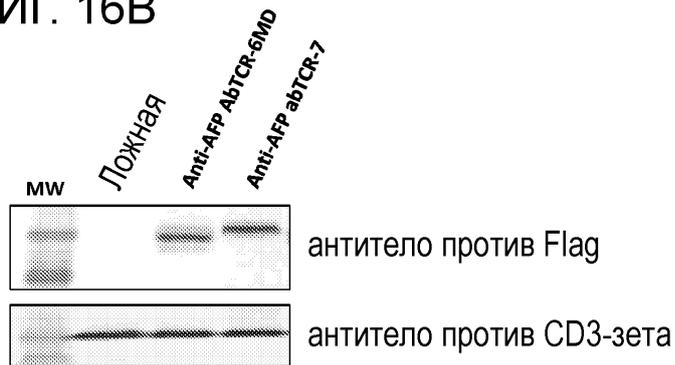


27/54

ФИГ. 16А

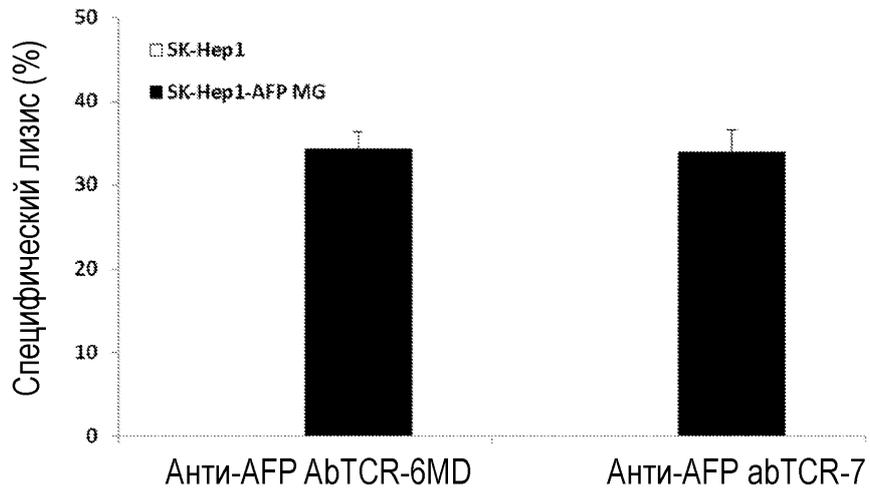


ФИГ. 16В

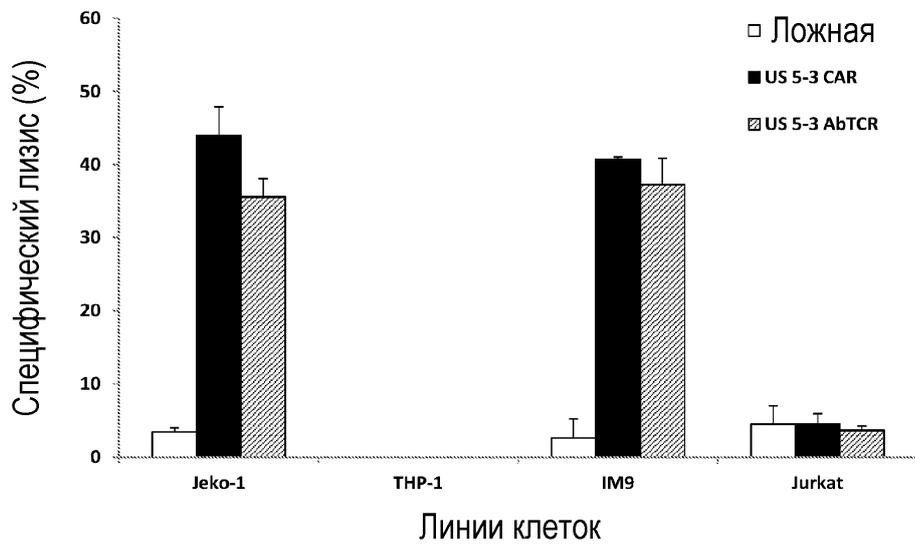


28/54

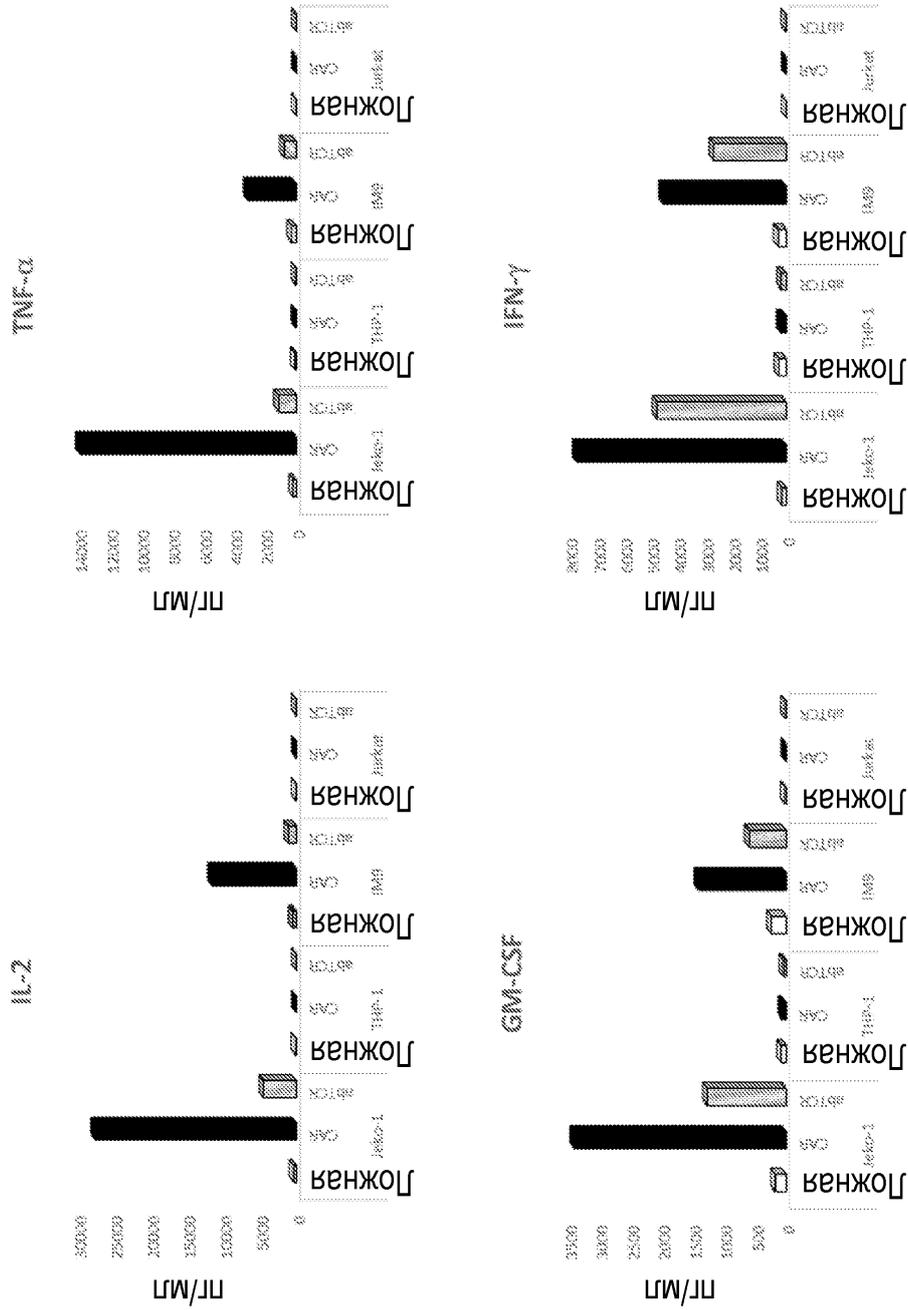
ФИГ. 16С



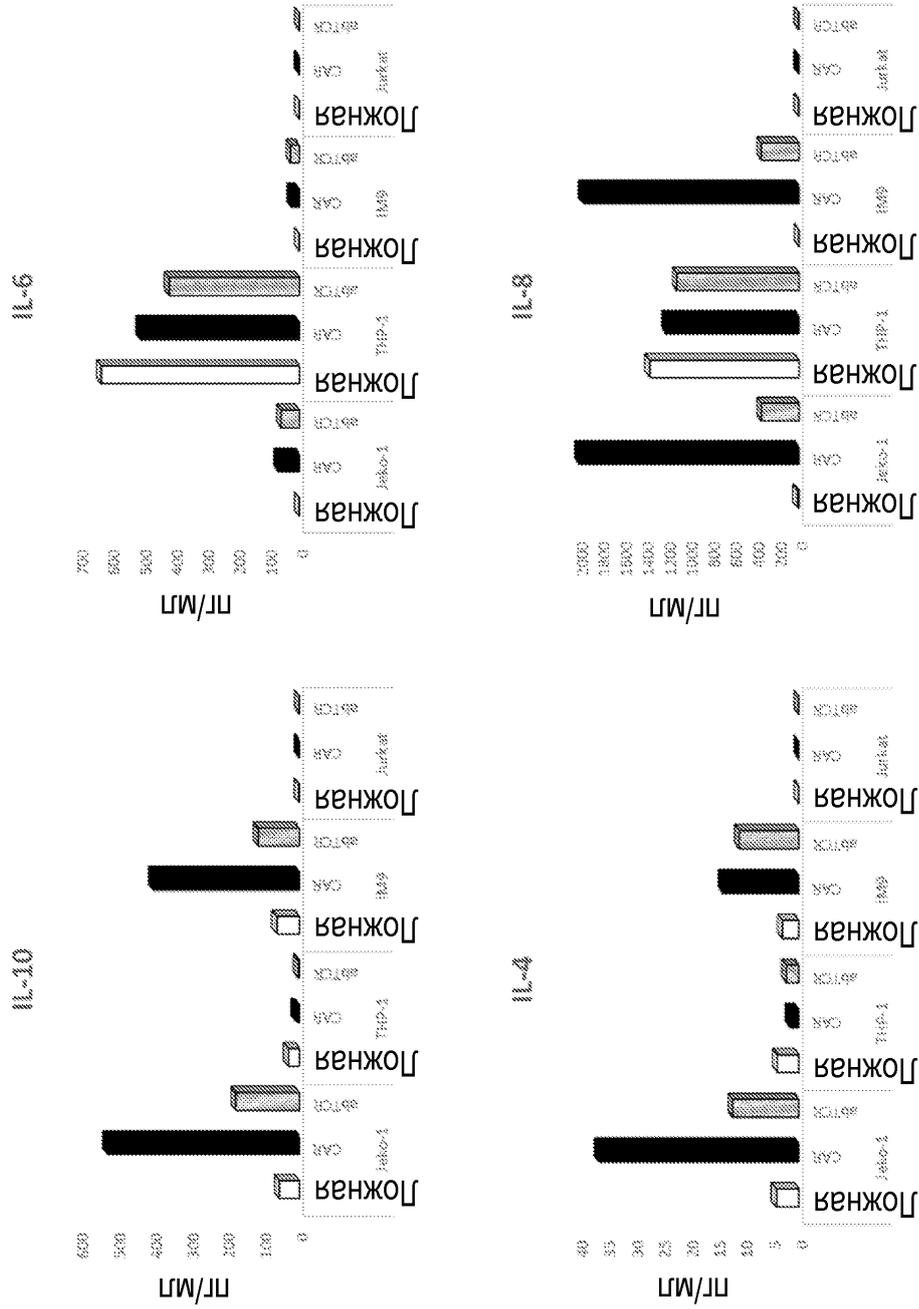
ФИГ. 17



ФИГ. 18А

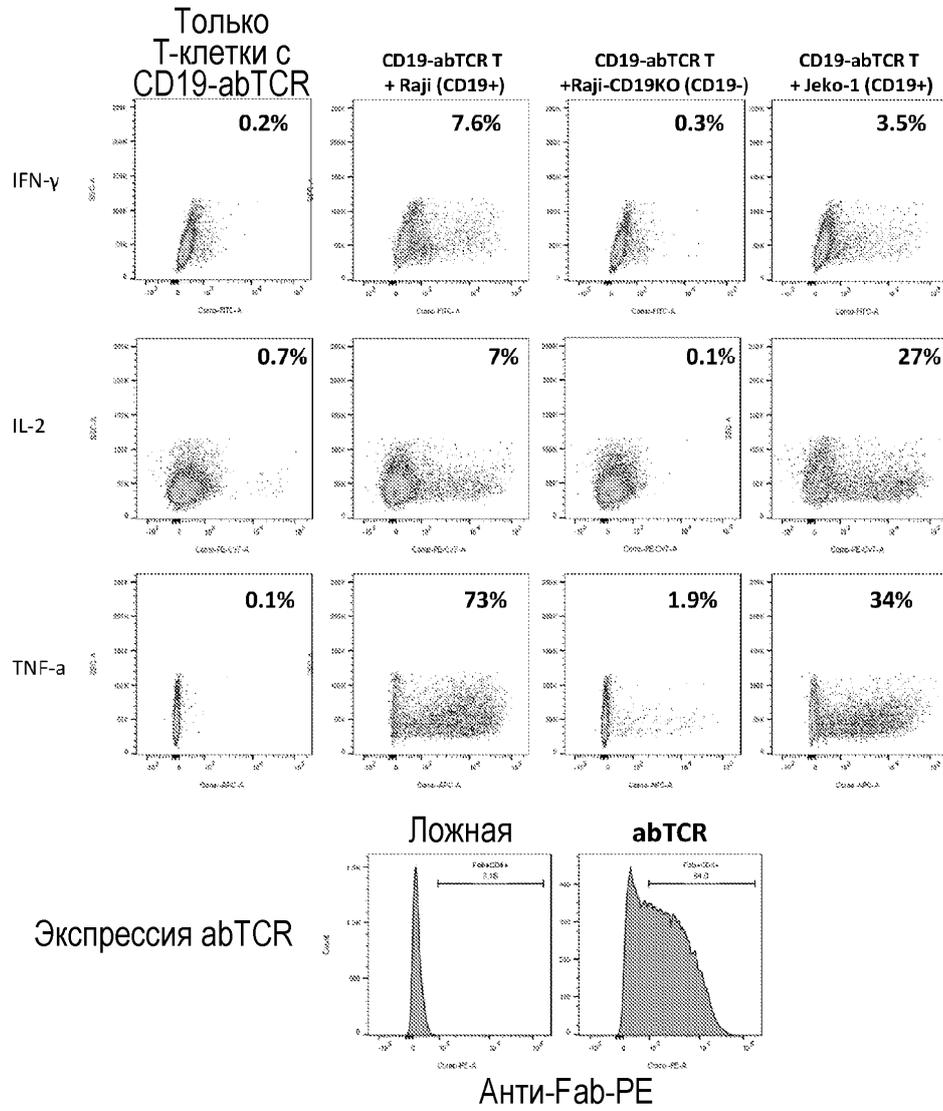


ФИГ. 18В 30/54



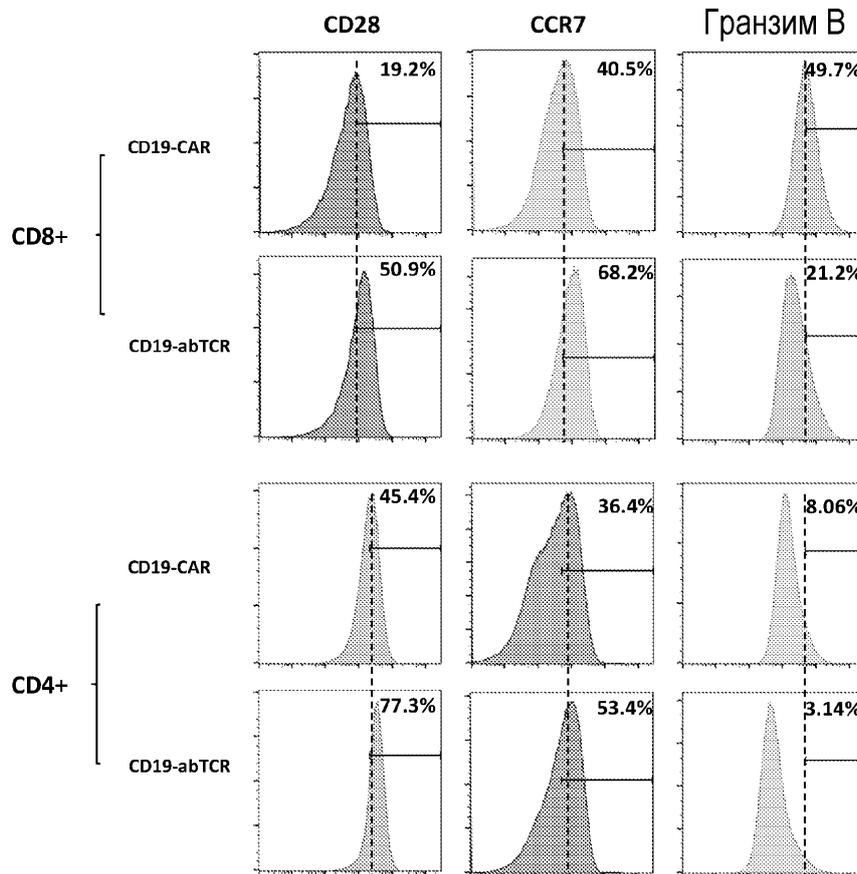
31/54

ФИГ. 19



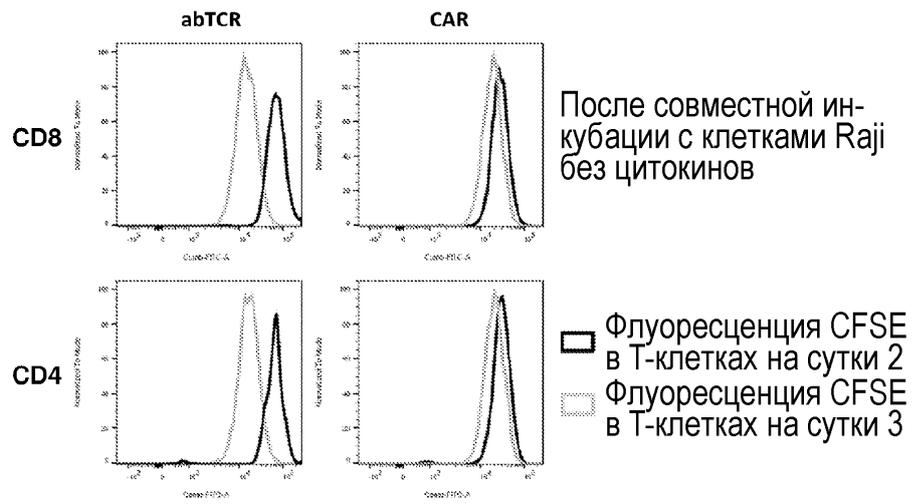
32/54

ФИГ. 20

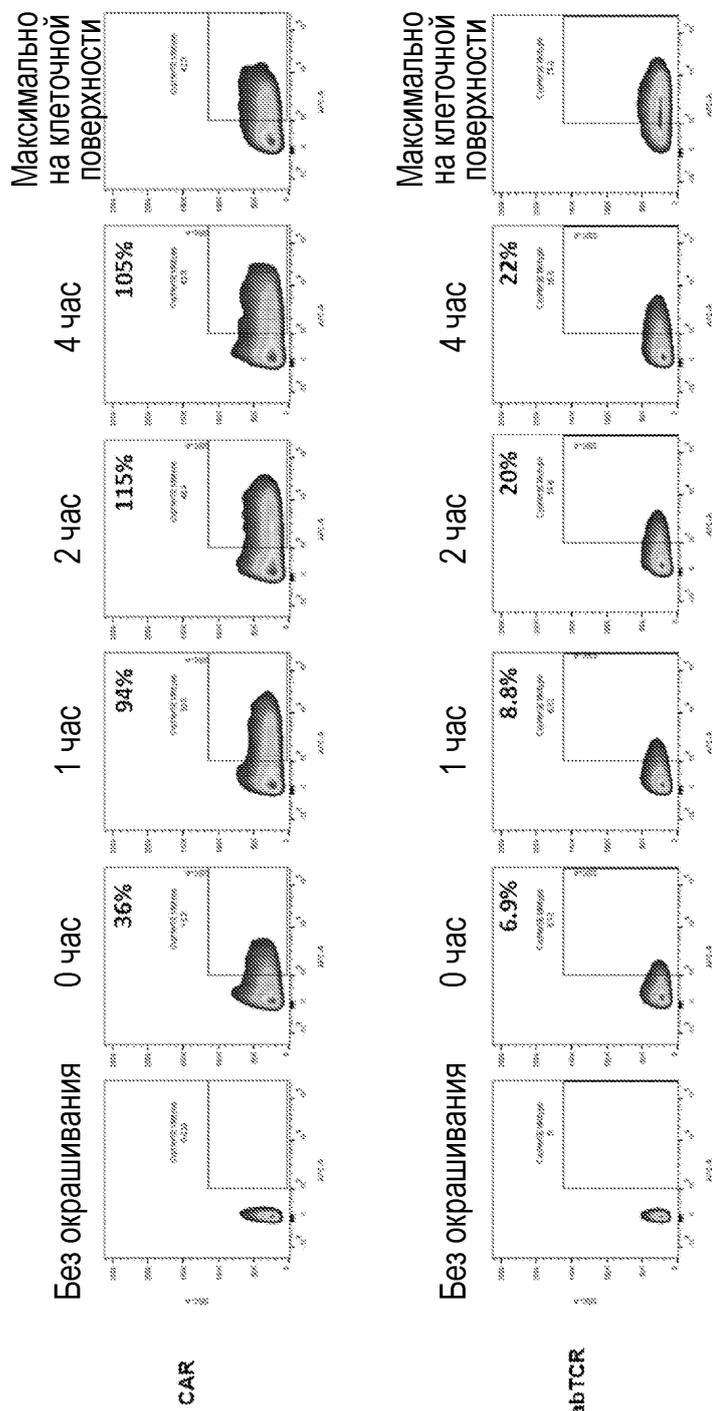


33/54

ФИГ. 21

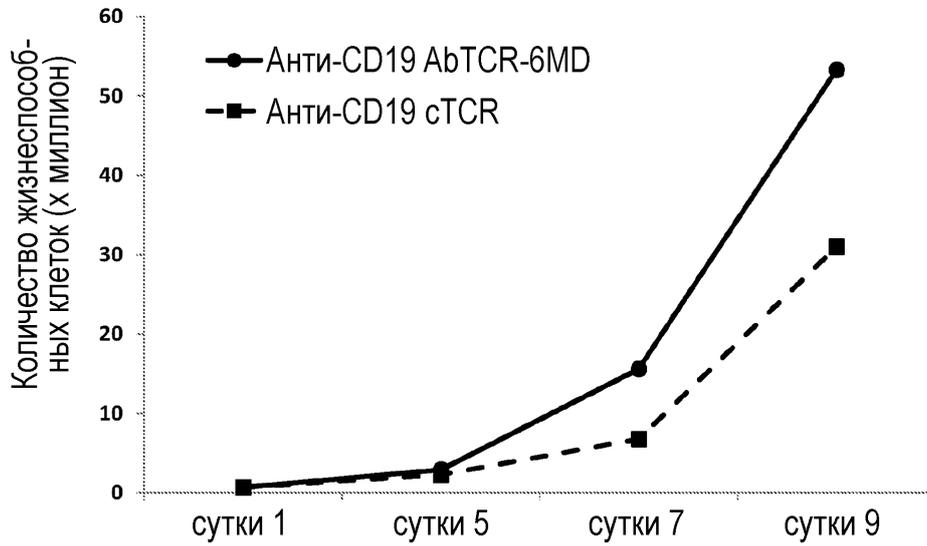


ФИГ. 22

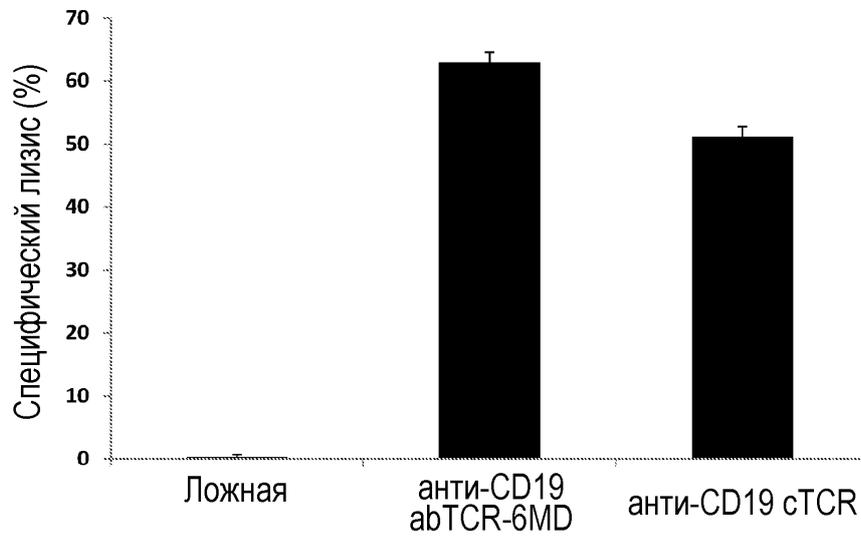


35/54

ФИГ. 23А

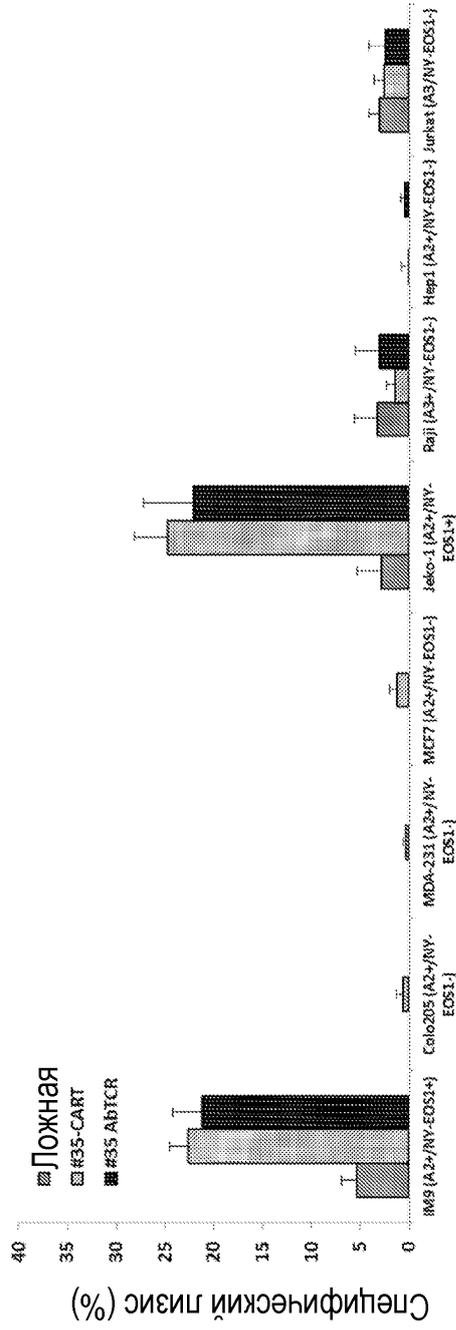


ФИГ. 23В



36/54

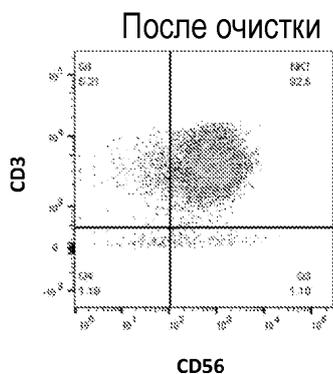
ФИГ. 24



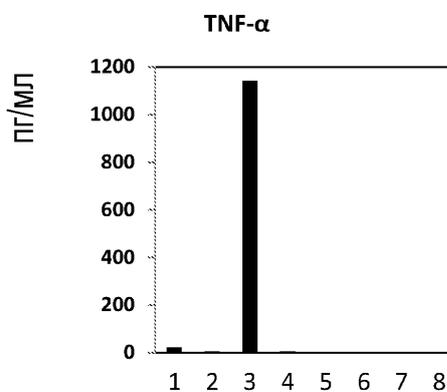
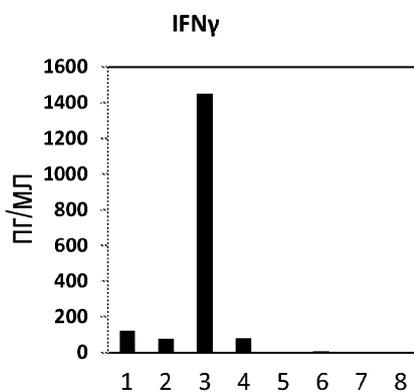
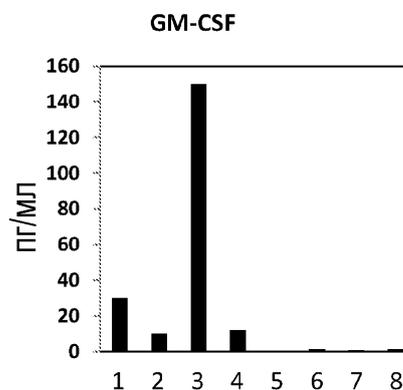
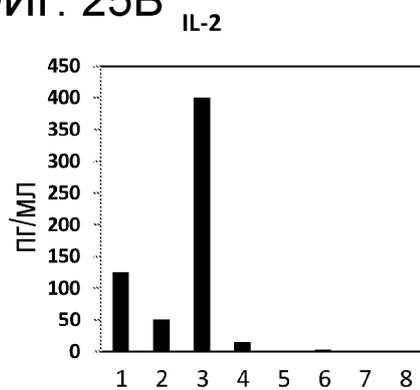
ЛИНИИ КЛЕТОК

37/54

ФИГ. 25А



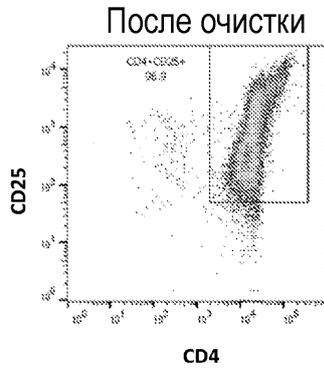
ФИГ. 25В



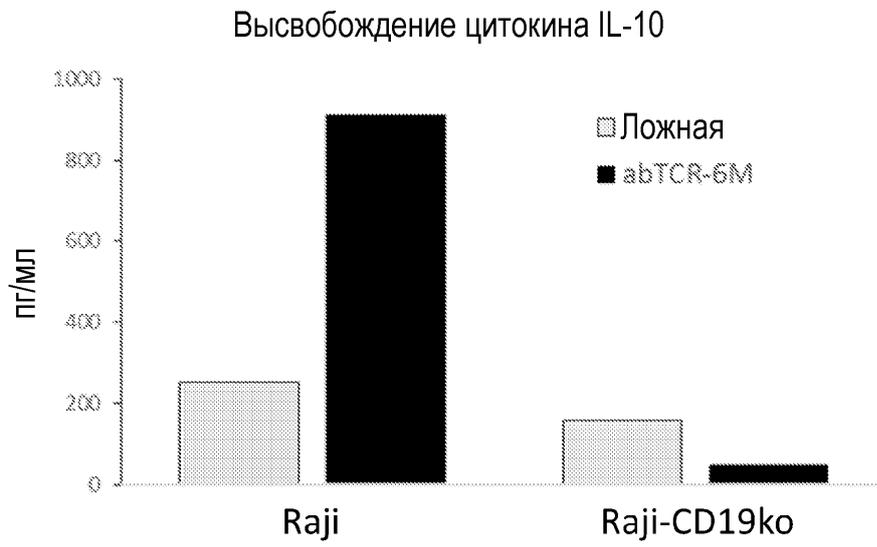
- | | |
|-----------------------|-----------------------|
| 1. Ложная+Raji | 5. Только ложная |
| 2. Ложная+Raji-CD19ko | 6. Только abTCR |
| 3. abTCR+Raji | 7. Только Raji |
| 4. abTCR+Raji-CD19ko | 8. Только Raji-CD19ko |

38/54

ФИГ. 26А

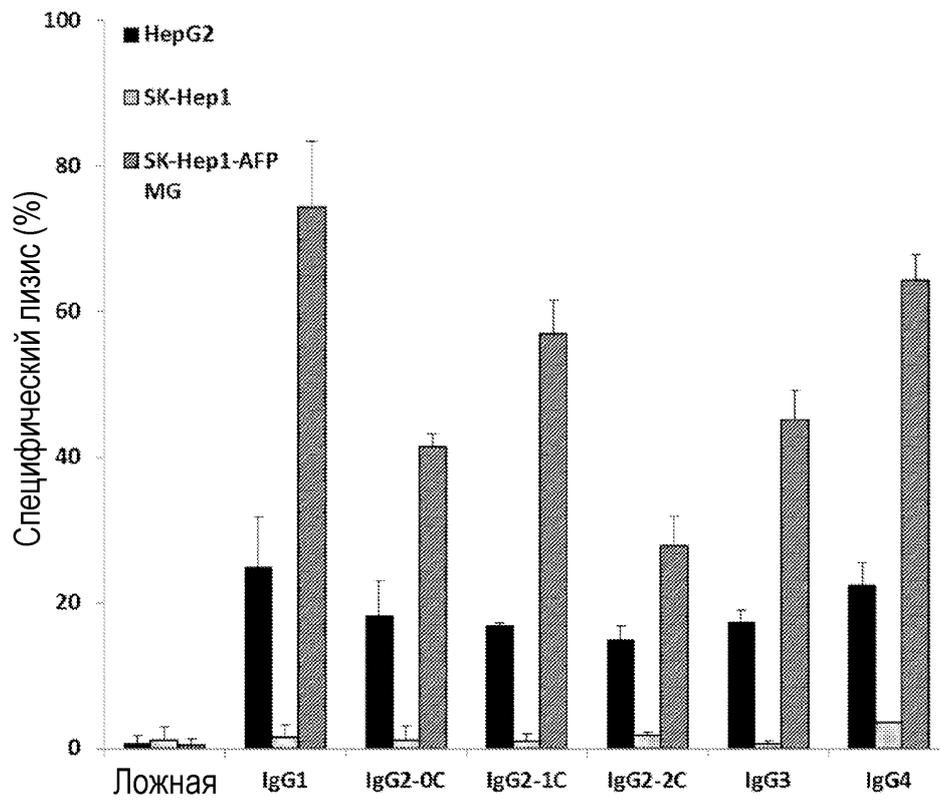


ФИГ. 26В

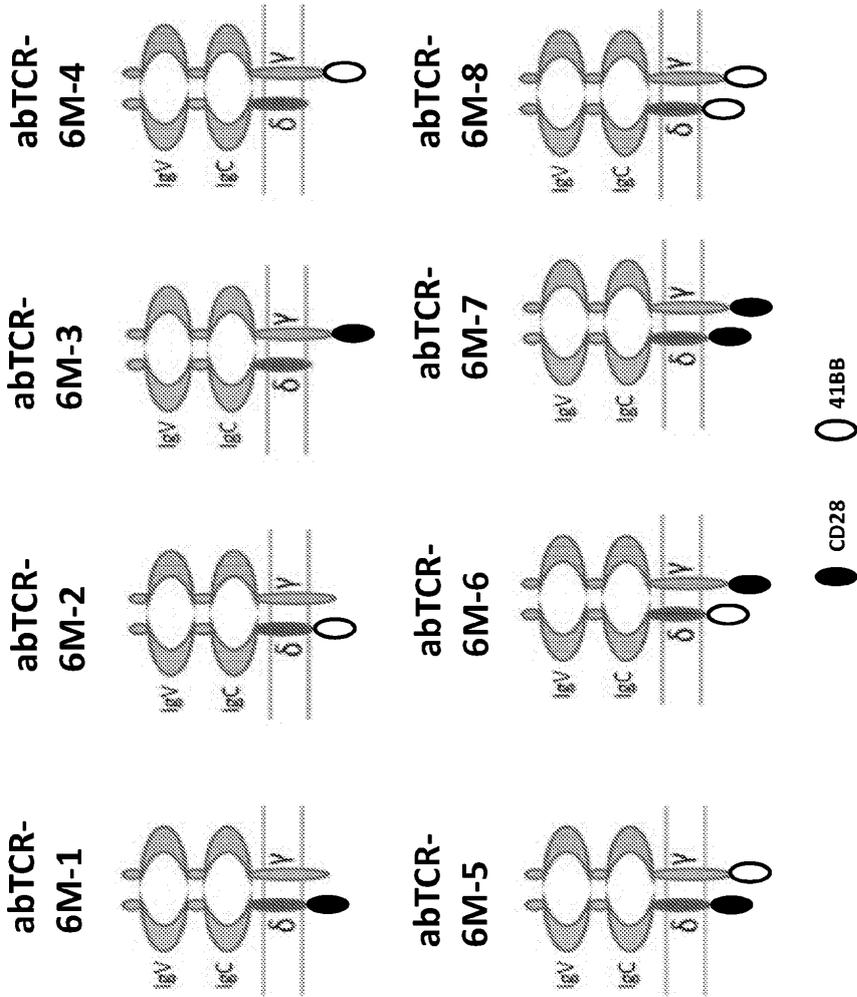


39/54

ФИГ. 27

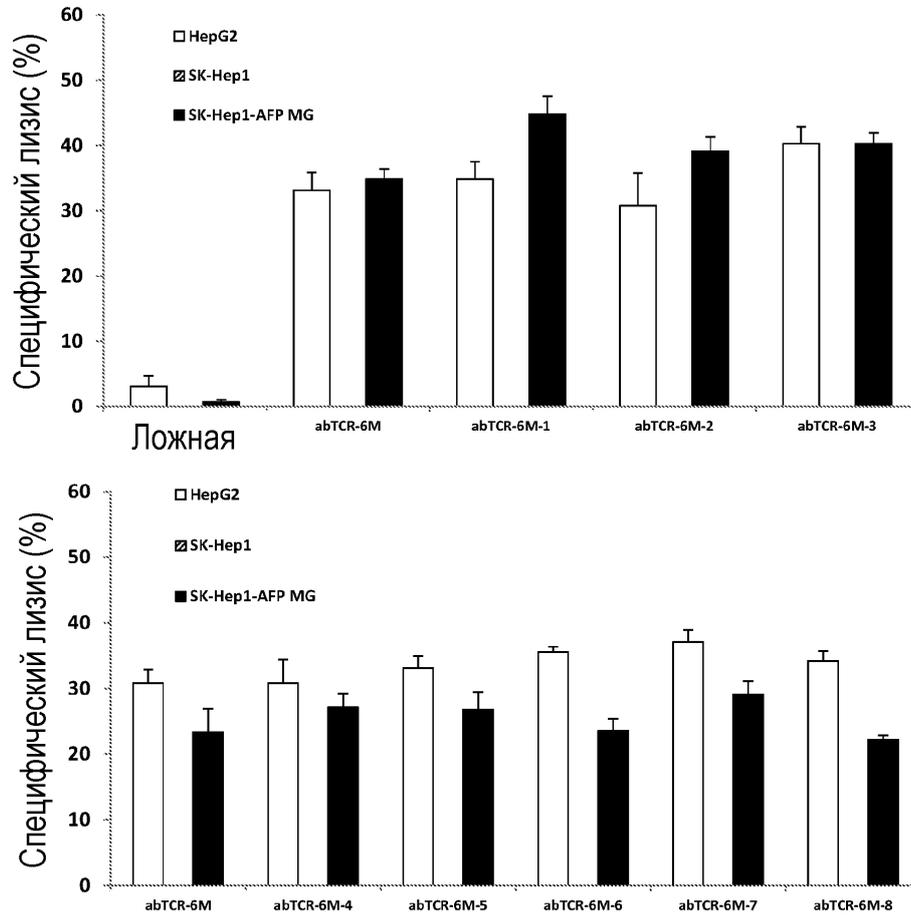


ФИГ. 28



41/54

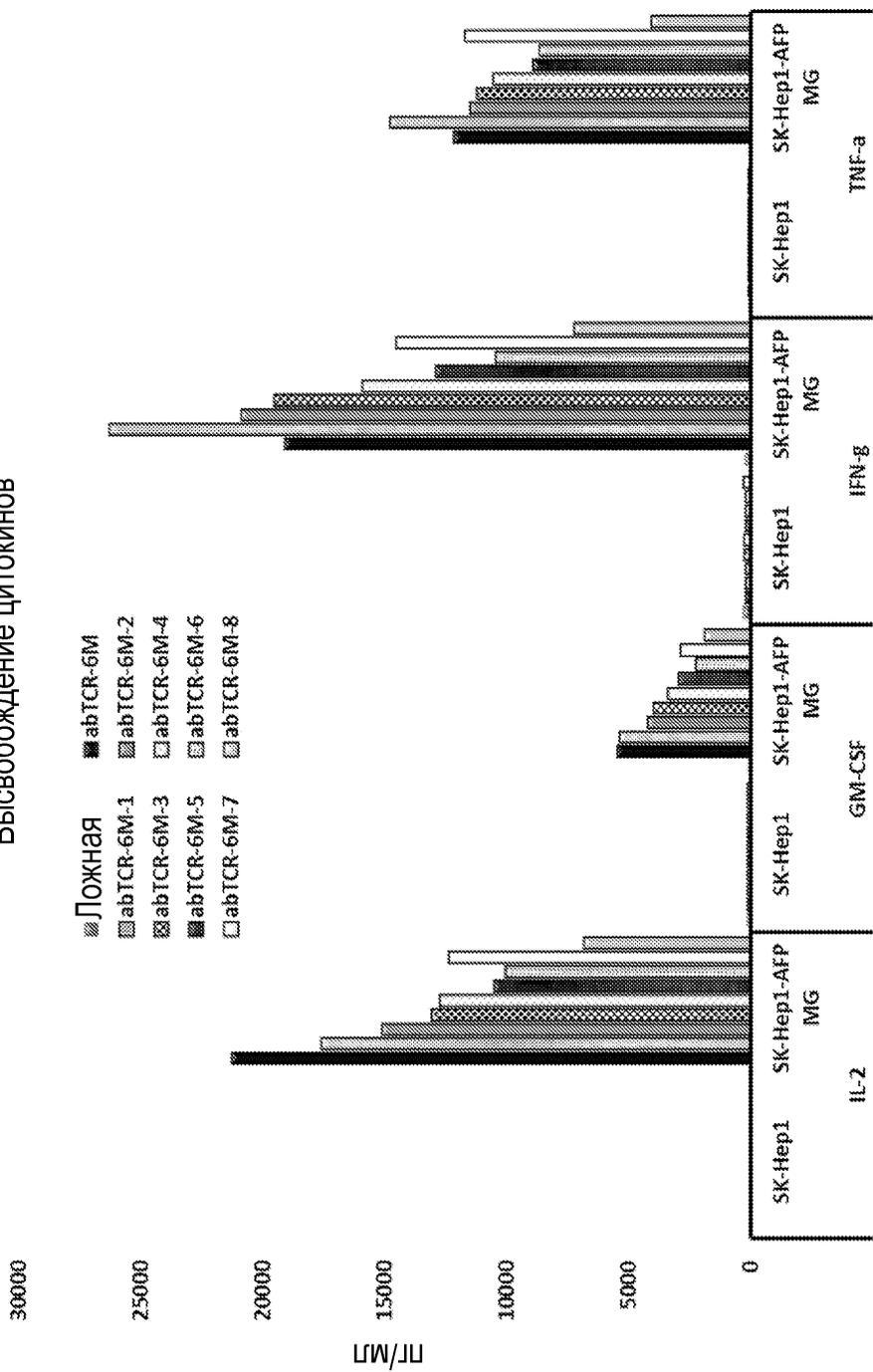
ФИГ. 29



42/54

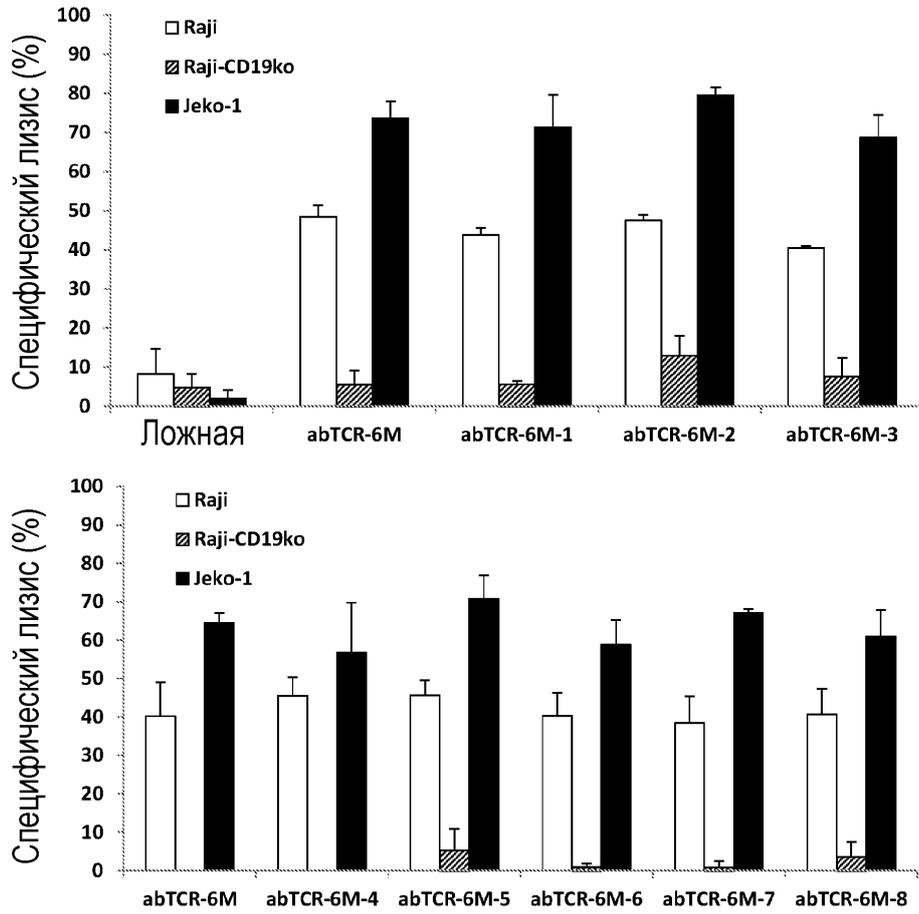
ФИГ. 30

Высвобождение цитокинов



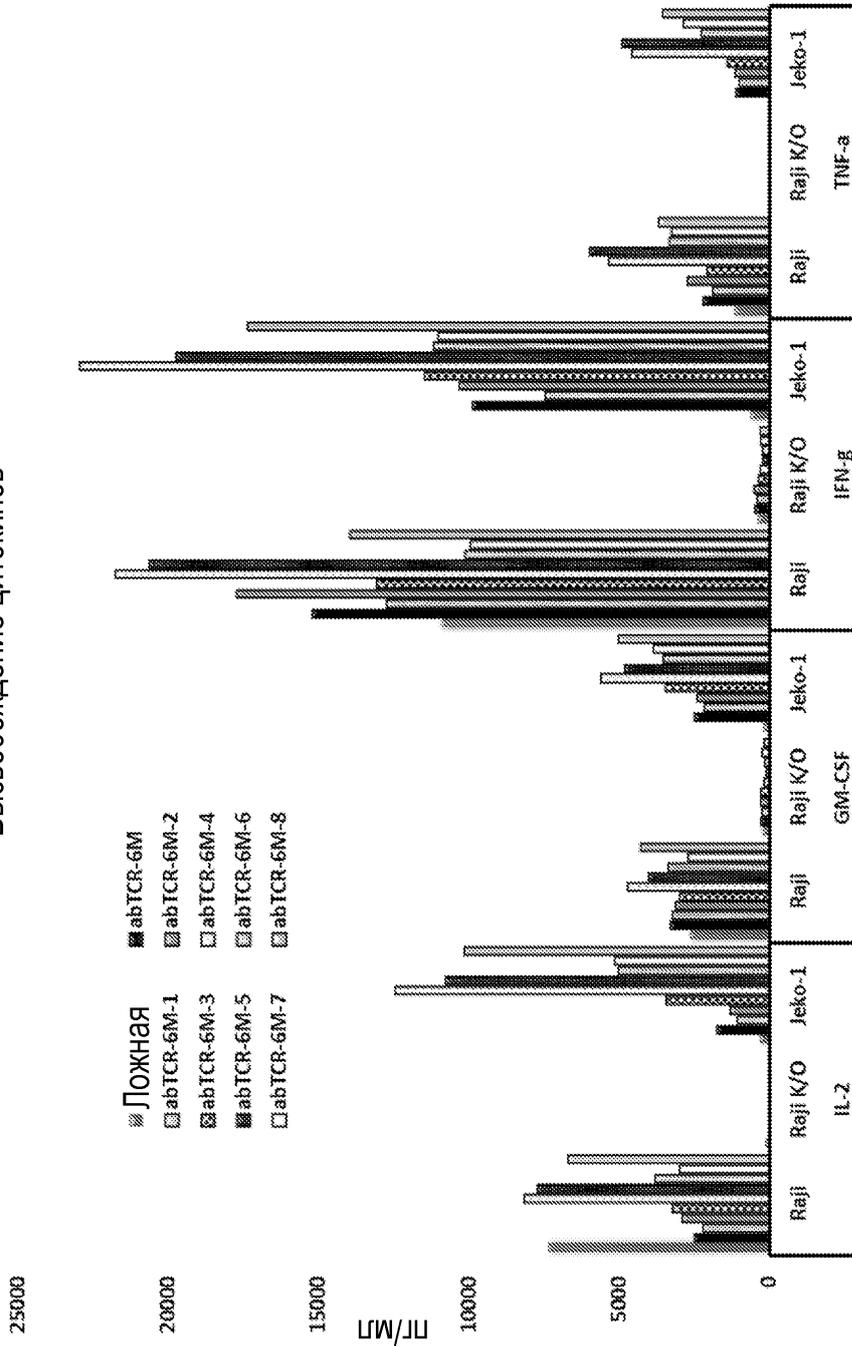
43/54

ФИГ. 31



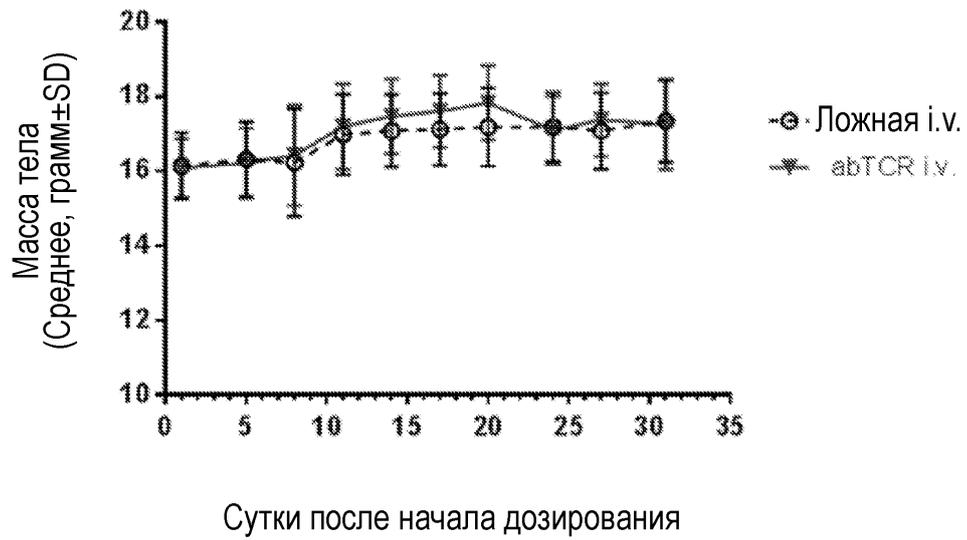
ФИГ. 32

Высвобождение цитокинов



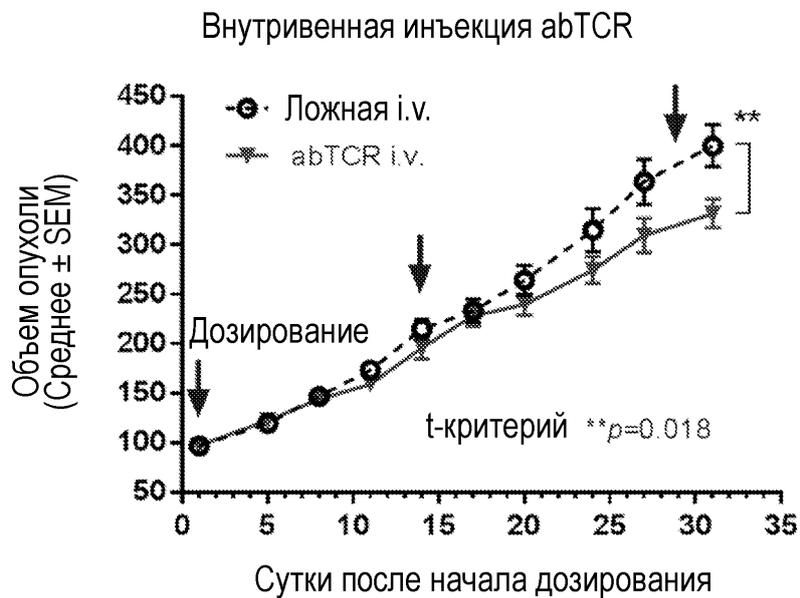
45/54

ФИГ. 33

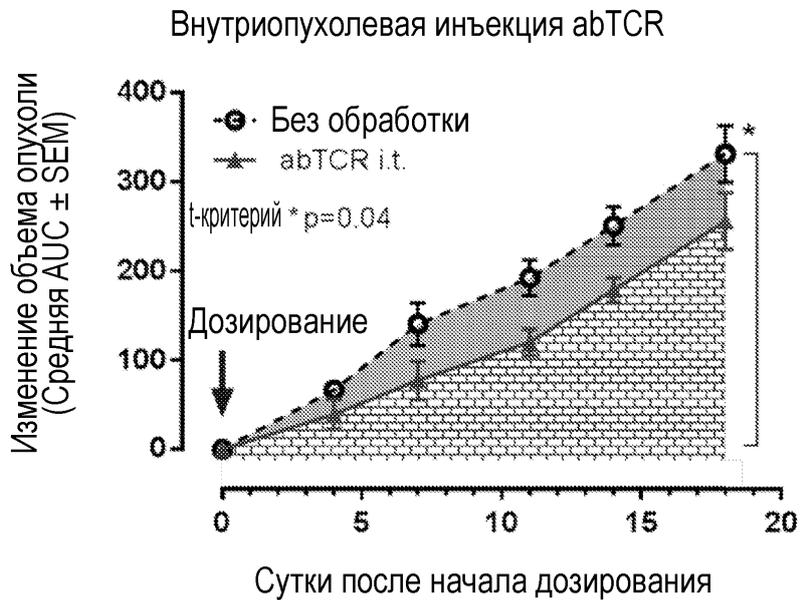


46/54

ФИГ. 34А

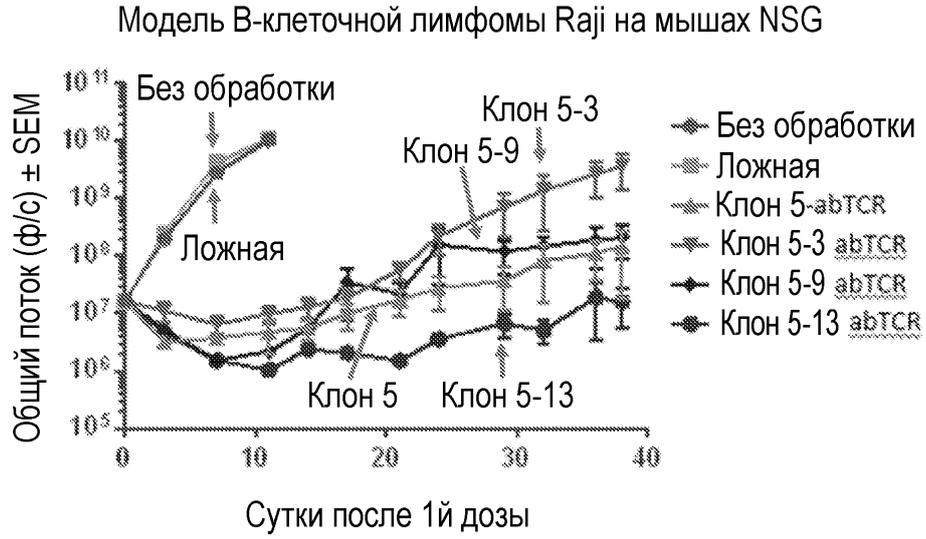


ФИГ. 34В



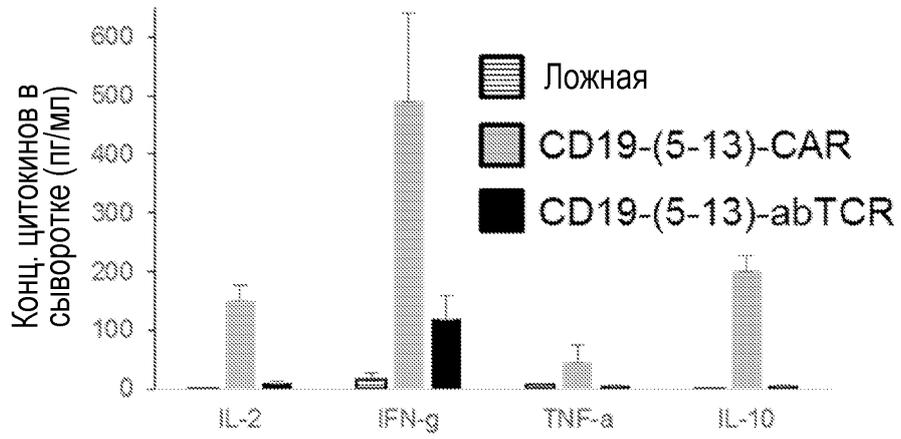
47/54

ФИГ. 35

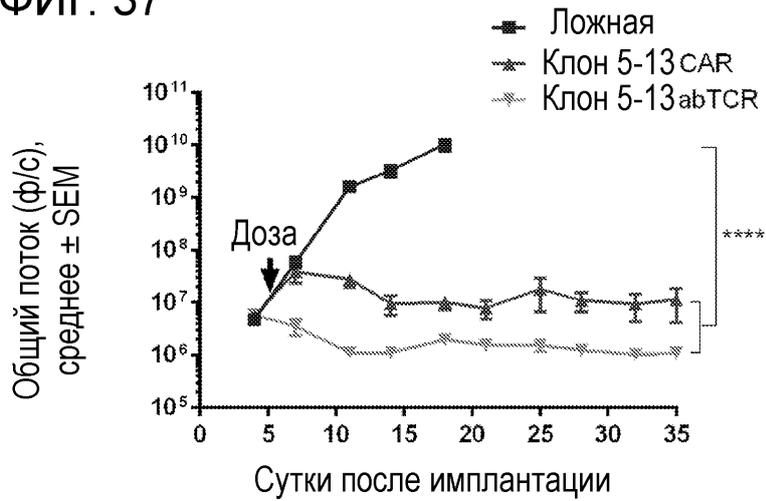


48/54

ФИГ. 36

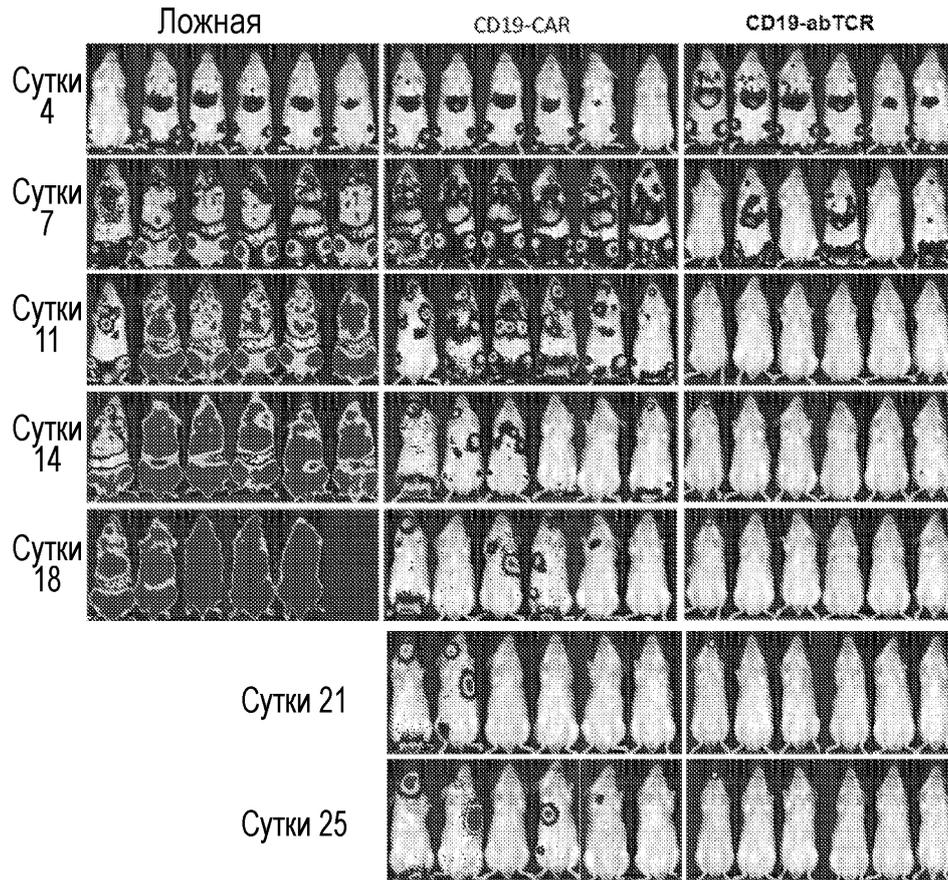


ФИГ. 37



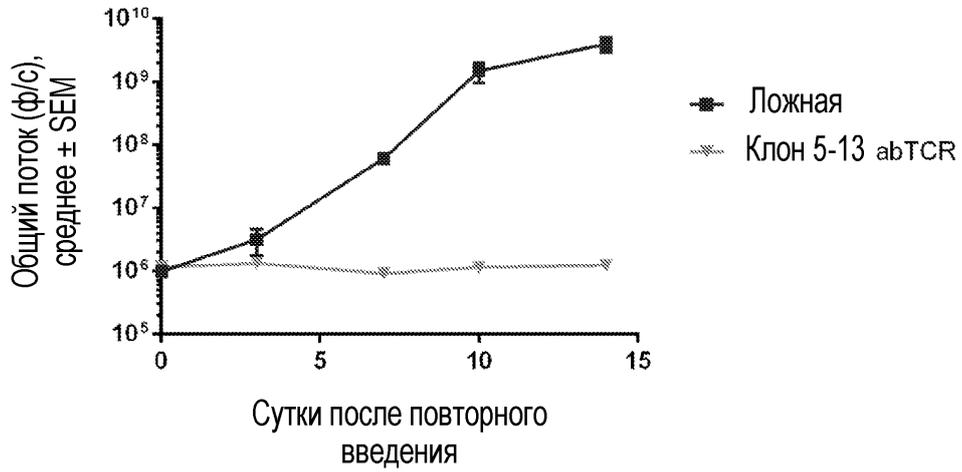
49/54

ФИГ. 38

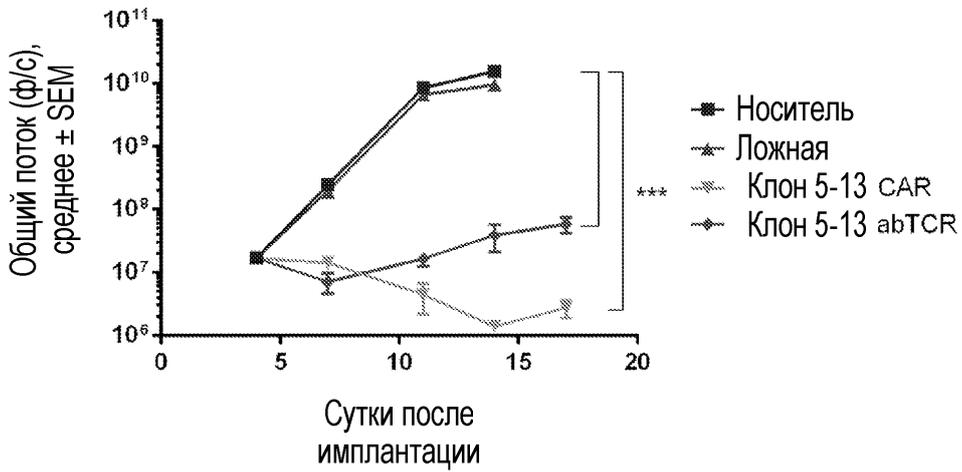


50/54

ФИГ. 39

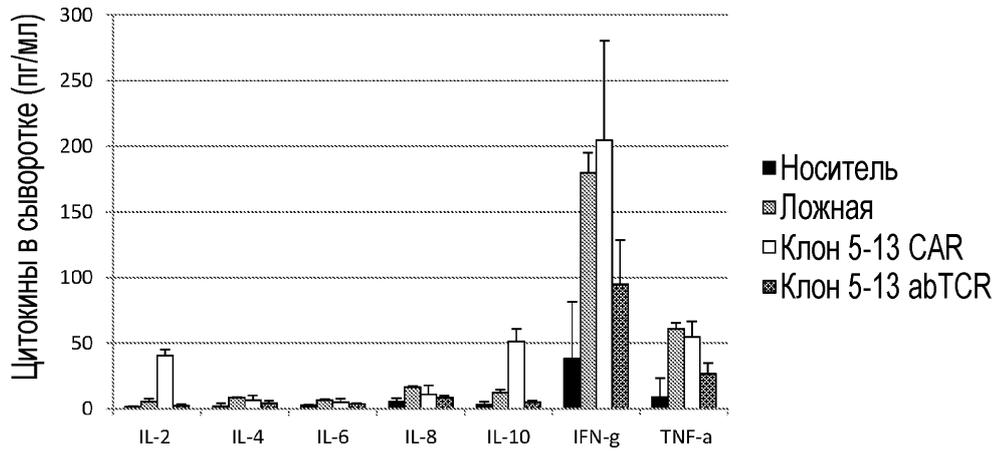


ФИГ. 40

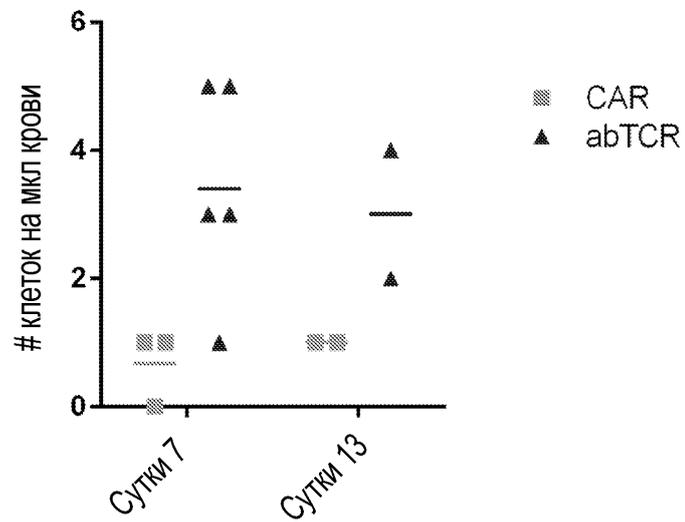


51/54

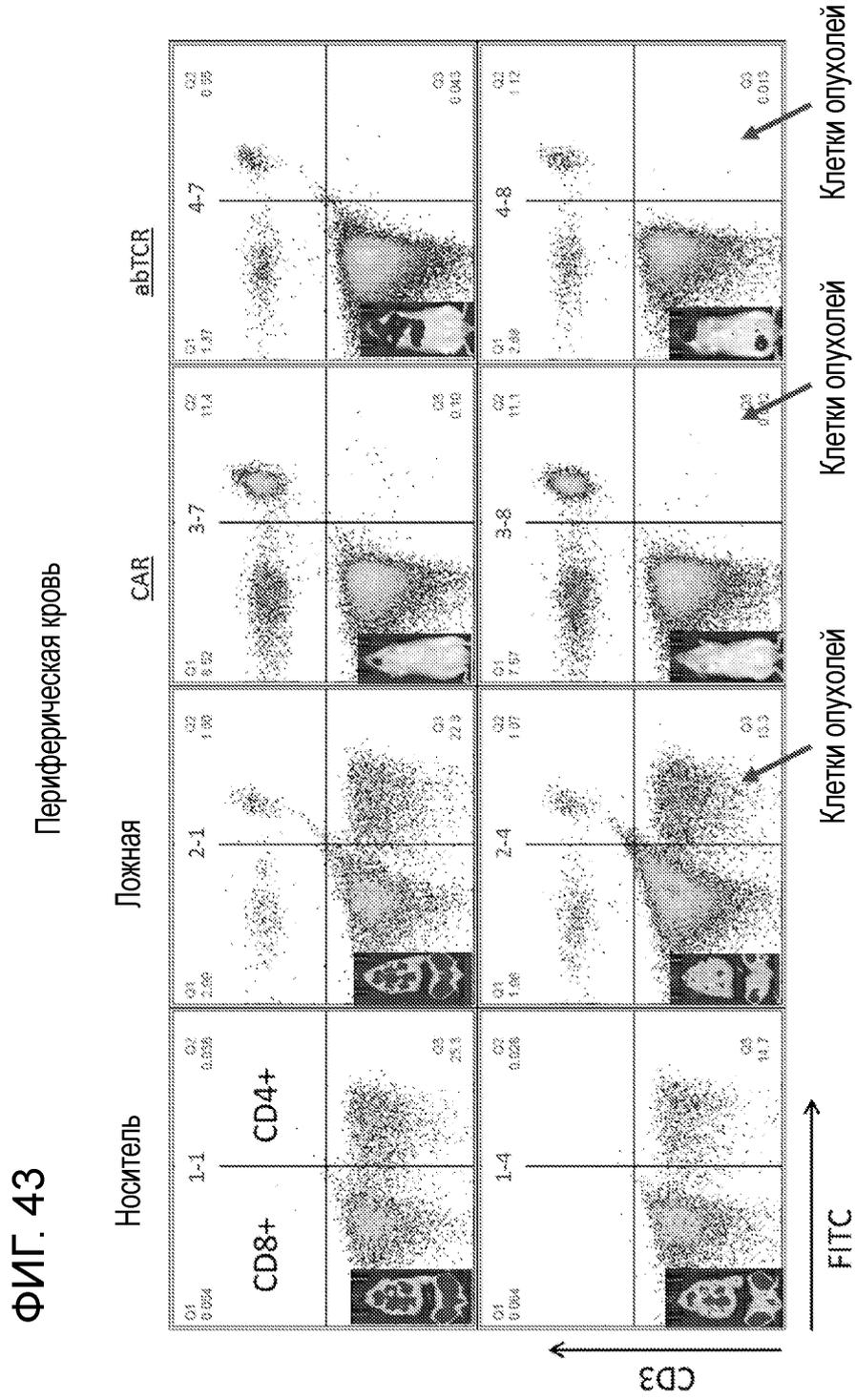
ФИГ. 41



ФИГ. 42



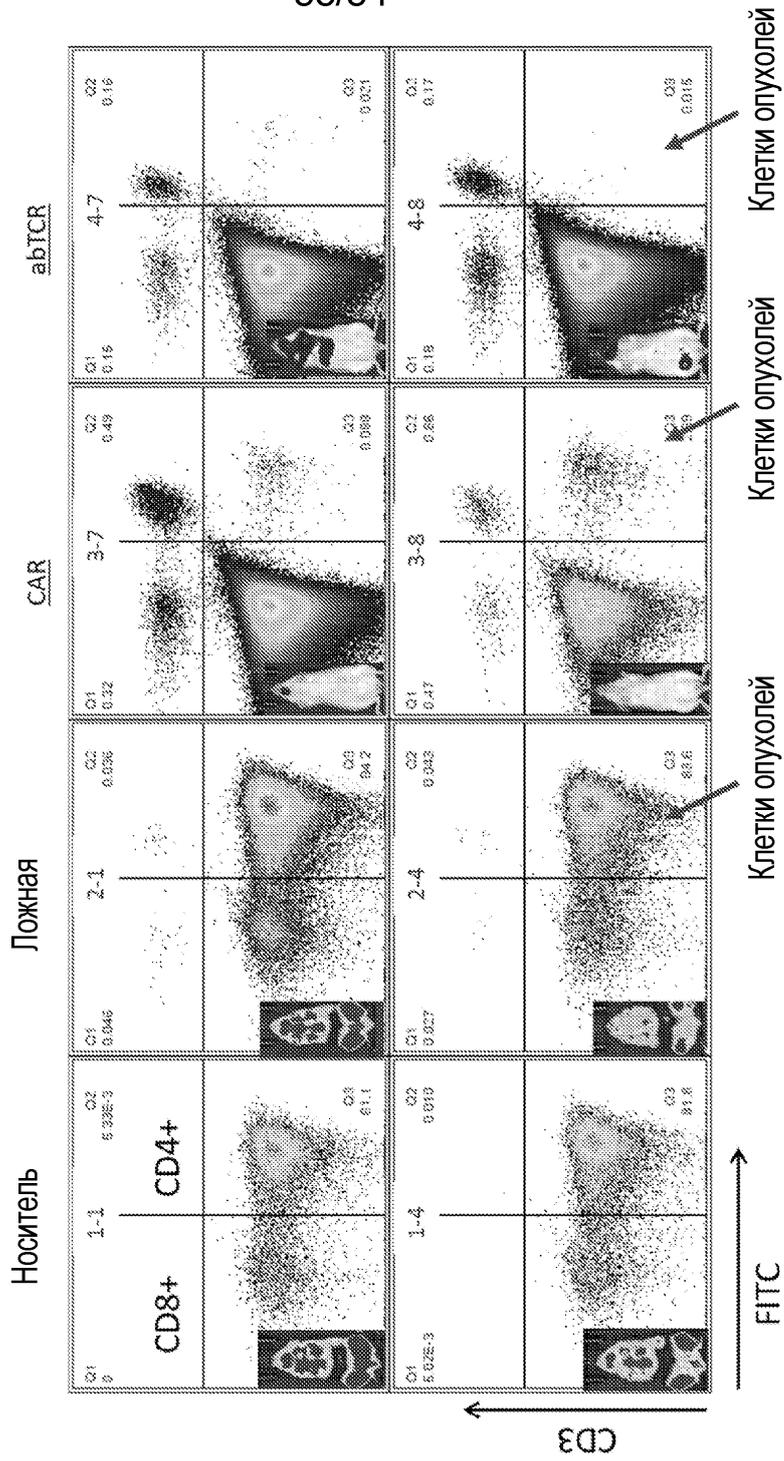
52/54



53/54

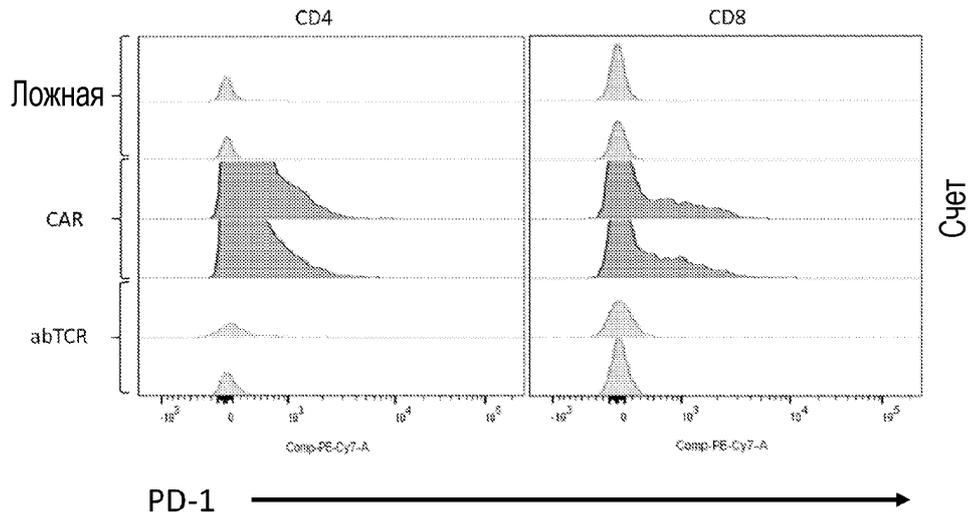
ФИГ. 44

Костный мозг



54/54

ФИГ. 45 Периферическая кровь, CD3+ Т-клетки



ФИГ. 46 Костный мозг, CD3+ Т-клетки

