

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **044866**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.10.06**

**(21)** Номер заявки  
**201892193**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2017.03.31**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 14/705** (2006.01)  
**C07K 14/725** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)

---

**(54) ХИМЕРНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ К FLT3 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

**(31)** 62/317,219

**(32)** 2016.04.01

**(33)** US

**(43)** 2019.06.28

**(86)** PCT/US2017/025613

**(87)** WO 2017/173410 2017.10.05

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**АМГЕН ИНК.; КАЙТ ФАРМА, ИНК.**  
**(US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Бэккер Элис, Ву Лорен, Арведсон  
Тара, Вилтзиус Джед Дж., Родригез  
Рубен Альварез (US)**

**(74)** Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

**(56)** WO-A2-2015142675

US-A1-2004043401

LI YIWEN ET AL.: "Suppression of leukemia expressing wild-type or ITD-mutant FLT3 receptor by a fully human anti-FLT3 neutralizing antibody", BLOOD, THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 104, no. 4, 15 August 2004 (2004-08-15), pages 1137-1144, XP002548252, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/BLOOD-2003-07-2585 [retrieved on 2004-04-22], abstract

PILOTO OBDULIO ET AL.: "Inhibitory anti-FLT3 antibodies are capable of mediating antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and reducing engraftment of acute myelogenous leukemia blasts in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice", CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 65, no. 4, 15 February 2005 (2005-02-15), pages 1514-1522, XP002548253, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3081, abstract

---

**(57)** В соответствии с изобретением раскрыты антигенсвязывающие молекулы, химерные рецепторы и разработанные иммунные клетки к FLT3. Настоящее изобретение дополнительно относится к векторам, композициям и способам лечения и/или обнаружения с использованием антигенсвязывающих молекул к FLT3 и разработанных иммунных клеток.

---

**B1**

**044866**

**044866 B1**

### Предпосылки создания изобретения

Острый миелоидный лейкоз (AML) представляет собой гетерогенную гематологическую злокачественную опухоль, которая является наиболее распространенным типом острого лейкоза, диагностированным у взрослых пациентов. AML составляет примерно треть всех случаев лейкоза, учитывая ожидаемые 14500 новых случаев, о которых сообщается в 2013 только в США, и низкие общие показатели выживаемости. Наблюдалось незначительное улучшение в стандарте лечения пациентов с AML в течение последних тридцати лет. Тем не менее, последние достижения в молекулярной и клеточной биологии радикально изменили наши представления о гемопоэзе человека, как в нормальном состоянии, так и в состоянии болезни. Были идентифицированы несколько ключевых игроков, участвующих в патогенезе заболевания, и они могут быть детально исследованы в качестве целевых задач. Одним из таких активирующих "драйверных" генов, которые наиболее часто являются мутированными примерно в 30% AML, является FLT3.

Fms-подобная тирозинкиназа 3 (FLT3), также известная как зародышевая печеночная киназа 2 (FLK-2), киназа человеческих стволовых клеток 1 (SCK-1) или антиген кластера дифференцировки (CD135), представляет собой связанную с кроветворением рецепторную тирозинкиназу, которую в 1990-х клонировали две независимые группы. Ген FLT3, расположенный в хромосоме 13q12 у людей, кодирует белок рецепторный тирозинкиназный белок рецепторной тирозинкиназы класса III, который разделяет гомологию с другими членами семейства класса III, в том числе рецептором фактора стволовых клеток (c-KIT), рецептором макрофагального колониестимулирующего фактора (FMS) и рецептором фактора роста тромбоцитов (PDGFR).

При связывании с лигандом FLT3 рецептор FLT3 подвергается гомогенизации, обеспечивая таким образом аутофосфорилирование специфичных остатков тирозина в околомембранном домене и последующую активацию посредством маршрутов PI3K/Akt, MAPK и STAT5. Таким образом, FLT3 играет решающую роль в контроле пролиферации, выживании и дифференциации нормальных гемопоэтических клеток. Человеческий FLT3 экспрессируется в CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> гемопоэтических стволовых клетках (HSC), а также в субпопуляции дендритных клеток-предшественников. Экспрессия FLT3 также может быть обнаружена в мультипотентных клетках-предшественниках, например, обычных миелоидных клеток-предшественников (CMP) CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD123<sup>low</sup>, клеток предшественников гранулоцитов и моноцитов (GMP) CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD123<sup>low</sup>, и общих лимфоидных клеток-предшественников (CLP) CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>. Примечательно, что экспрессия FLT3 практически отсутствует в CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD123<sup>-</sup> клетках-предшественниках мегакариоцитов и эритроцитов (MEP). Таким образом, экспрессия FLT3 в основном заключается в ранних миелоидных и лимфоидных клетках-предшественниках с некоторой экспрессией в более зрелых клетках ряда моноцитов. Данный ограниченный профиль экспрессии FLT3 поразительно контрастирует с профилем экспрессии лиганда FLT3, который экспрессируется в большинстве гемопоэтических тканей и в предстательной железе, почке, легком, толстом кишечнике и сердце. Данные различные профили экспрессии, например, экспрессия FLT3, представляют собой стадию, ограничивающую скорость реакции, в определении тканевой специфичности сигнальных путей FLT3.

Наиболее распространенная мутация FLT3 в AML представляет собой внутреннюю тандемную дупликацию FLT3 (FLT3-ITD), которая обнаружена у 20-38% пациентов с цитогенетически нормальным AML. FLT3-ITD образуются, когда часть околомембранного домена, кодирующего последовательность, дублируется и вставляется в ориентации "голова-к-хвосту". Мутации FLT3 не были идентифицированы у пациентов с хроническим лимфоидным лейкозом (ХЛЛ), не-ходжкинской лимфомой и множественной миеломой, из чего можно заключить о сильной специфичности заболевания для AML. Мутантная активация FLT3 обычно наблюдается во всех подтипах FAB, тем не менее, она значительно повышается у пациентов, имеющих AML, с FAB M5 (моноцитарный лейкоз), тогда как подтипы M2 и M6 FAB (гранулоцитарный или эритроидный лейкоз) значительно реже связаны с активацией FLT3, в линии с нормальными профилями экспрессии FLT3. У небольшого процента пациентов с AML (5-7%) присутствуют одиночные аминокислотные мутации в тирозинкиназном домене FLT3 (FLT3 TKD), наиболее часто в D835 или, в некоторых случаях, в T842 или 1836, тогда как у еще меньшего количества пациентов (~1%) имеют скрытую мутацию в околомембранном домене FLT3 с участием остатков 579, 590, 591 и 594. Пациенты с мутированным FLT3-ITD AML имеют агрессивную форму заболевания, которая характеризуется ранним рецидивом и низкой выживаемостью, тогда как общая выживаемость и бессобытийная выживаемость значительно не подвергаются влиянию присутствия мутаций FLT3-TKD. Кроме того, пациенты с AML, имеющие мутацию FLT3-ITD, с одновременными мутациями TET2 или DNMT3A, имеют нежелательный общий профиль риска по сравнению с пациентами, имеющими мутированный FLT3-ITD AML, с TET2 или DNMT3A дикого типа, что подчеркивает клиническую и биологическую гетерогенность AML.

Как мутации FLT3-ITD, так и мутации FLT3 TKD включают лиганд-зависимую активацию FLT3, которая приводит к последующей активации маршрута Ras/MAPK и маршрутов PI3K/Akt. Тем не менее, последующие сигнализующие маршруты, связанные с любой мутацией, отличаются, прежде всего, тем, что предположительная активация STAT5 посредством FLT3-ITD, что приводит, таким образом, к повышению потенциала пролиферации и неправильной регуляции маршрутов восстановления ДНК.

Независимо от статуса мутации FLT3 фосфорилирование FLT3 проявляется у более чем двух тре-

тей пациентов с AML, и FLT3 экспрессируется в более 80% бластах AML и у порядка 90% всех пациентов с AML, что делает его привлекательной терапевтической мишенью, связанной с патогенезом заболевания в выборке большого размера.

Несколько ингибиторов малых молекул возникли в качестве привлекательных возможных способов лечения для пациентов с AML с мутациями FLT3. Первое поколение ингибиторов тирозинкиназы FLT3 (TKI) характеризовалось отсутствием селективности, силы и нежелательными фармакокинетическими свойствами. Для борьбы с этим вопросом никогда не были разработаны новые и более селективные средства; тем не менее, их эффективность была ограничена возникновением вторичной резистентности. Несколько ранних FLT3 TKI помимо прочих включали мидостаурин (PKC412), лестауртиниб (CEP-701), сунитиниб (SU11248) и сорафиниб (BAY 43-9006). Скорости ответа в фазе I и фазе II с данными средствами, нацеленными на несколько киназ, у пациентов с рецидивирующим или резистентным AML ограничены, предположительно, в связи с их неспособностью достигать эффективного ингибирования FLT3 без ограничивающих дозу токсичностей. Квизартиниб (AC220) был разработан в качестве второго поколения FLT3 TKI с высокой селективностью к FLT3 дикого типа и FLT3-ITD, и продемонстрировал преимущество, в частности, при установке перитрансплантата у более младшей группы пациентов. Тем не менее, вторичные мутации в FLT3, обнаруженные у пациентов с рецидивом, которые получали квизартиниб, подчеркивают необходимость разработки лучших терапевтических стратегий для пациентов с AML, выделяя при этом обоснованность FLT3 в качестве терапевтической мишени.

Некоторые нацеленные средства были протестированы у пациентов с AML либо с первичным, рецидивирующим/резистентным, либо с вторичным заболеванием. Эпигенетический сайленсинг подавляющих опухоль генов играет важную роль в патогенезе заболевания AML, и ингибиторы метилтрансферазы ДНК (DNMT), такие как азацитадин и децитабин, достигли некоторого клинического успеха. Кроме того, последнее обнаружение мутаций, которые негативно воздействуют на посттрансляционные модификации гистона (например, мутации EZH2 и ASXL1) или метилирование ДНК (например, DNMT3A, TET2, IDH1/2) в субпопуляции пациентов с AML, обеспечили развитие разнообразных возможных способов лечения, в том числе ингибиторов EZH2, DOT1L, IDH1/2 вместе с HDAC и ингибиторами протеазы. Тем не менее, доклинические исследования множества данных компонентов в клетках AML предполагают, что данные ингибиторы может изменять характеристики фенотипической и генной экспрессии гемопоэтической дифференциации, нежели вызывать непосредственную цитотоксичность бластов AML. Следовательно, остается сильная неудовлетворенная медицинская потребность в идентификации новых мишеней/способов для борьбы с AML и вызывания нацеленного лизиса клеток-бластов AML. Другие терапевтические кандидаты для AML включают ингибиторы киназы Auroга, в том числе AMG 900 и ингибиторы для Polo-подобных киназ, которые играют важную роль в прогрессировании клеточного цикла. Стандарт лечения для пациентов с AML по-прежнему представлял собой химиотерапию с трансплантацией стволовых клеток по возможности. Тем не менее, возникновение случаев рецидива/резистентности у значительного большинства леченных пациентов гарантирует дополнительные терапевтические способы. Идентификация и описание нескольких специфических к лейкозу антигенов вместе с более ясным пониманием иммуно-опосредованных эффект "трансплантат против лейкоза" проложили путь для развития иммуномодуляторных стратегий для борьбы с гематологическими злокачественными новообразованиями, рассмотренных в нескольких статьях. Было показано, что разработанные иммунные клетки обладают необходимыми качествами в терапевтических способах лечения, в частности, в онкологии. Два основных типа разработанных иммунных клеток представляют собой клетки, которые содержат химерные антигенные рецепторы (называемые "CAR" или "CAR-T") и Т-клеточные рецепторы ("TCR"). Данные разработанные клетки разработаны для обеспечения антигенспецифичности для них, поддерживая или усиливая их способность распознавать и уничтожать клетку-мишень. Химерные антигенные рецепторы могут содержать, например, (i) антиген-специфичный компонент ("антигенсвязывающую молекулу"), (ii) один или несколько костимулирующих доменов и (iii) один или несколько активирующих доменов. Каждый домен может быть гетерогенным, то есть, состоять из последовательностей, образованных из различных белковых цепей. Экспрессирующие химерный антигенный рецептор иммунные клетки (например, Т-клетки) могут применяться в различных вариантах терапии, в том числе, вариантах терапии рака. Следует понимать, что костимулирующие полипептиды, как указано в данном документе, можно применять для усиления активации CAR-экспрессирующих клеток против антигенов-мишеней и, следовательно, повышать силу адаптивной иммунотерапии.

Т-клетки могут быть разработаны для обладания специфичностью к одному или нескольким необходимым мишеням. Например, Т-клетки могут быть трансфицированы с помощью ДНК или другого генетического материала, кодирующего антигенсвязывающую молекулу, например, одного или нескольких переменных фрагментов антитела с одной цепью ("scFv"), вместе с одной или несколькими сигнализующими молекулами, и/или одного или нескольких активирующих доменов, например, CD3 зета.

Помимо способности CAR-Т-клеток распознавать и разрушать клетки-мишени успешная Т-клеточная терапия повышает способность CAR-Т-клеток сохраняться и поддерживать способность к пролиферации в ответ на антиген.

Рецепторы Т-клеток (TCR) представляют собой молекулы, обнаруженные на поверхности Т-клеток,

которые отвечают за распознавание фрагментов антигена в качестве пептидов, связанных с основными молекулами комплекса гистосовместимости (МНС). TCR состоит из двух различных белковых цепей - примерно в 95% человеческих TCR, TCR состоит из альфа ( $\alpha$ ) и бета ( $\beta$ ) цепи. Примерно в 5% человеческих Т-клеток TCR состоит из гамма и дельта ( $\gamma/\delta$ ) цепей, каждая цепь составлена из двух внеклеточных доменов: варибельной области (V) и постоянной области (C), обе из надсемейства иммуноглобулинов. Как и в других иммуноглобулинах, каждый из варибельных доменов  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи TCR (или гамма и дельта ( $\gamma/\delta$ ) цепи) имеют три гиперварибельные или определяющие комплементарность области (CDR). Если TCR взаимодействует с антигенным пептидом и МНС (пептид/МНС), то Т-клетка становится активированной, обеспечивая ее поражение и уничтожение клетки-мишени.

Тем не менее, существующие в настоящее время варианты терапии показали переменные уровни эффективности с нежелательными побочными эффектами. Следовательно, существует потребность в идентификации новых и улучшенных вариантов терапии для лечения связанных с FLT3 заболеваний и нарушений.

#### **Изложение сущности изобретения**

Настоящее изобретение относится к разработанным иммунным клеткам (например, CAR или TCR), антигенсвязывающим молекулам (в том числе без ограничения антителам, scFv, тяжелым и/или легким цепям и CDR данных антигенсвязывающих молекул) со специфичностью к FLT3.

Настоящее изобретение также относится к новой последовательности CD28, пригодной в качестве костимулирующих доменов в данных клетках.

Химерные антигенные рецепторы по настоящему изобретению обычно включают следующее: (i) FLT3-специфичную антигенсвязывающую молекулу, (ii) один или несколько костимулирующих доменов и (iii) один или несколько активирующих доменов. Следует понимать, что каждый домен может быть гетерогенной, таким образом, состоять из последовательностей, образованных из различных белковых цепей.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к химерному антигенному рецептору, включающему антигенсвязывающую молекулу, которые специфично связываются с FLT3, при этом антигенсвязывающая молекула содержит по меньшей мере одно из следующего: (a) варибельная область CDR1 тяжелой цепи, содержащая аминокислотную последовательность, которая отличается от последовательности в SEQ ID NO: 17 не более чем на 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков; (b) варибельная область CDR2 тяжелой цепи, содержащая аминокислотную последовательность, которая отличается от последовательности в SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 26 не более чем на 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков; (c) варибельная область CDR3 тяжелой цепи, содержащая аминокислотную последовательность, которая отличается от последовательности в SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 27 не более чем на 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков; (d) варибельная область CDR1 легкой цепи, содержащая аминокислотную последовательность, которая отличается от последовательности в SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 30 не более чем на 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков; (e) варибельная область CDR2 легкой цепи, содержащая аминокислотную последовательность, которая отличается от последовательности в SEQ ID NO: 23 или 31 не более чем на 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков; (f) варибельная область CDR3 легкой цепи, содержащая аминокислотную последовательность, которая отличается от последовательности в SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 32 не более чем на 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков.

В других вариантах осуществления химерный антигенный рецептор дополнительно содержит по меньшей мере один костимулирующий домен. В следующих вариантах осуществления химерный антигенный рецептор дополнительно содержит по меньшей мере один активирующий домен.

В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен представляет собой сигнальную область CD28, CD28T, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, Programmed Death-1 (PD-1), индуцируемый костимулятор Т-клеток (ICOS), связанный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1, CDI-la/CD18), CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig альфа (CD79a), DAP-10, Fc гамма рецептор, молекулу МНС класса I, TNF рецепторные белки, белок иммуноглобулин, рецептор к цитокинам, интегрин, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM), активирующие рецепторы NK-клеток, BTLA, рецептор к Толл-лигандам, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8 альфа, CD8 бета, IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDI Id, ITGAE, CD103, ITGAL, CDI Ia, LFA-1, ITGAM, CDI Ib, ITGAX, CDI Ic, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, лиганд, который специфично связывается с CD83, или любые их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен получен из 4-1BB. В других вариантах осуществления костимулирующий домен получен из OX40. См. также Hombach et al., Oncoimmu-

nology. 2012 Jul. 1; 1(4): 458-466. В следующих вариантах осуществления костимулирующий домен содержит ICOS, как описано в Guedan et al., August 14, 2014; Blood: 124 (7) и Shen et al., Journal of Hematology & Oncology (2013) 6:33. В следующих вариантах осуществления костимулирующий домен содержит CD27, как описано в Song et al., Oncoimmunology. 2012 Jul. 1; 1(4):547-549.

В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен CD28 содержит SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 8. В дополнительных вариантах осуществления костимулирующий домен CD8 содержит SEQ ID NO: 14. В следующих вариантах осуществления активирующий домен содержит CD3, CD3 дзета, или CD3 дзета с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 10.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к химерному антигенному рецептору, где костимулирующий домен содержит SEQ ID NO: 2, а активирующий домен содержит SEQ ID NO: 10.

Настоящее изобретение также относится к полинуклеотидам, кодирующим химерные антигенные рецепторы, и векторам, содержащим полинуклеотиды. Вектор может представлять собой, например, ретровирусный вектор, вектор ДНК, плазмиду, вектор РНК, аденовирусный вектор, связанный с аденовирусом вектор, лентивирусный вектор или любые их комбинации. Настоящее изобретение также относится к иммунным клеткам, содержащим векторы. В некоторых вариантах осуществления лентивирусный вектор представляет собой вектор pGAR.

Иллюстративные иммунные клетки включают без ограничения Т-клетки, проникающие в опухоль лимфоциты (TIL), NK-клетки, TCR-экспрессирующие клетки, дендритные клетки или NK-Т-клетки. Т-клетки могут быть аутологическими, аллогенными или гетерологичными. В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим иммунные клетки, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам (и химерным антигенным рецепторам, содержащим данные молекулы), содержащим по меньшей мере одно из следующего:

(a) область VH, которая отличается от аминокислотной последовательности области VH в 10E3 не более чем на 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков, и область VL, которая отличается от аминокислотной последовательности области VL в 10E3 не более чем на 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков;

(b) область VH, которая отличается от аминокислотной последовательности области VH в 2E7 не более чем на 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков, и область VL, которая отличается от аминокислотной последовательности области VL в 2E7 не более чем на 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков;

(c) область VH, которая отличается от аминокислотной последовательности области VH в 8B5 не более чем на 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков, и область VL, которая отличается от аминокислотной последовательности области VL в 8B5 не более чем на 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков;

(d) область VH, которая отличается от аминокислотной последовательности области VH в 4E9 не более чем на 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков, и область VL, которая отличается от аминокислотной последовательности области VL в 4E9 не более чем на 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков;

(e) область VH, которая отличается от аминокислотной последовательности области VH в 11F11 не более чем на 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков, и область VL, которая отличается от аминокислотной последовательности области VL в 10E3 не более чем на 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков;

и где область VH и VL или области связаны посредством по меньшей мере одного линкера.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам (и химерные антигенные рецепторы, содержащие данные молекулы), где линкер содержит по меньшей мере один из линкера scFv G4S и линкера scFv Whitlow.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к векторам, кодирующим полипептиды по настоящему изобретению, и к иммунным клеткам, содержащим данные полипептиды. Предпочтительные иммунные клетки включают Т-клетки, проникающие в опухоль лимфоциты (TIL), NK-клетки, TCR-экспрессирующие клетки, дендритные клетки или NK-Т-клетки. Т-клетки могут быть аутологическими, аллогенными или гетерологичными.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенным полинуклеотидам, кодирующим химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR), содержащим антигенсвязывающую молекулу, которая специфично связывается с FLT3, где антигенсвязывающая молекула содержит вариабельную область CDR3 тяжелой цепи (V<sub>H</sub>), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 27. Полинуклеотиды могут дополнительно содержать активирующий домен. В предпочтительных вариантах осуществления активирующий домен представляет собой CD3, более предпочтительно CD3 дзета, более предпочтительно аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение включает костимулирующий домен, например CD28, CD28T, OX40, 4-1BB/CD137, CD2, CD3 (альфа, бета, дельта, эпсилон, гамма, дзета), CD4, CD5, CD7, CD9, CD16, CD22, CD27, CD30, CD33, CD37, CD40, CD 45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, PD-1, ICOS, связанный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1 (CD11a/CD18), CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT (член надсемейства факторов некроза опухоли 14; TNFSF14), NKG2C, Ig альфа (CD79a), DAP-10, Fc гамма рецептор, молекула MHC класса I, TNF, TNF $\alpha$ , интегрин, сигнальная молекула активации лимфоцитов, BTLA, рецептор к Толл-лигандам, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$ , IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, CD83 лиганд, или их фрагменты или комбинации. Предпочтительные костимулирующие домены представлены ниже в данном документе.

В следующих вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенным полинуклеотидам, кодирующим химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR), где указанный CAR или TCR содержит антигенсвязывающую молекулу, которая специфично связывается с FLT3, и где антигенсвязывающая молекула содержит вариабельную область CDR3 легкой цепи (V<sub>L</sub>), содержащую аминокислотную последовательность, выбранная из SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 32. Полинуклеотид может дополнительно содержать активирующий домен. Полинуклеотид может дополнительно содержать костимулирующий домен.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенным полинуклеотидам, кодирующим химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточному рецептору (TCR), содержащему антигенсвязывающую молекулу, которая специфично связывается с FLT3, где тяжелая цепь антигенсвязывающей молекулы содержит CDR1 (SEQ ID NO: 17), CDR2 (SEQ ID NO: 18), и CDR3 (SEQ ID NO: 19) и легкая цепь антигенсвязывающей молекулы содержит CDR1 (SEQ ID NO: 22), CDR2 (SEQ ID NO: 23), и CDR3 (SEQ ID NO: 24).

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенным полинуклеотидам, кодирующим химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточному рецептору (TCR), содержащему антигенсвязывающую молекулу, которая специфично связывается с FLT3, где тяжелая цепь антигенсвязывающей молекулы содержит CDR1 (SEQ ID NO: 17), CDR2 (SEQ ID NO: 26), и CDR3 (SEQ ID NO: 27) и легкая цепь антигенсвязывающей молекулы содержит CDR1 (SEQ ID NO: 30), CDR2 (SEQ ID NO: 31), и CDR3 (SEQ ID NO: 32).

Настоящее изобретение дополнительно относится к антигенсвязывающим молекулам, связывающимся с FLT3, содержащим по меньшей мере одну последовательность вариабельной области CDR3 тяжелой цепи или последовательности вариабельной области CDR3 легкой цепи, как указано в данном документе. Настоящее изобретение дополнительно относится к антигенсвязывающим молекулам, связывающимся с FLT3, содержащим по меньшей мере одну последовательность вариабельной области CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи в соответствии с описанием в данном документе. Настоящее изобретение дополнительно относится к антигенсвязывающим молекулам, связывающимся с FLT3, содержащим по меньшей мере одну последовательность вариабельной области CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, как описано в данном документе. Настоящее изобретение дополнительно относится к антигенсвязывающим молекулам, связывающимся с FLT3, содержащим как последовательности вариабельных областей CDR1, CDR2, CDR3 тяжелой цепи, так и последовательности вариабельных областей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, как описано в данном документе.

Дополнительные вариабельные домены тяжелой и легкой цепей, полинуклеотид CDR и аминокислотные последовательности, пригодные для применения в FLT3-связывающих молекулах в соответствии с настоящим изобретением, найдены в Предварительной заявке на патент № 62/199944, поданной 31 июля 2015 г.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способам лечения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающим введение субъекту антигенсвязывающих молекул, CAR, TCR, полинуклеотидов, векторов, клеток или композиций по настоящему изобретению. Пригодные для лечения заболевания включают без ограничения острый миелоидный лейкоз (AML), хронический миелоидный лейкоз (CML), хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML), ювенильный миеломоноцитарный лейкоз, атипичный хронический миелоидный лейкоз, острый промиелоцитарный лейкоз (APL), острый монобластный лейкоз, острый эритроидный лейкоз, острый мегакариобластный лейкоз, миелодиспластический синдром (MDS), миелопролиферативное нарушение, миелоидное новообразование, миелоидная саркома) или их комбинации. Дополнительные заболевания включают воспалительные и/или аутоиммунные заболевания, например, ревматоидный артрит, псориаз, виды аллергии, астма, болезнь Крона, IBD, IBS, фибромиалгию, мастоцитоз и глютеную энтеропатию.

### Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показана проточная цитометрия экспрессии поверхности клеток FLT3 на человеческих клеточных линиях.

На фиг. 2 показана экспрессия CAR в первичных человеческих Т-клетках, электропорированных с mRNA, кодирующая различные CAR.

На фиг. 3 показана цитолитическая активности электропорированных Т-клеток CAR в сравнении с несколькими клеточными линиями после 16 ч совместного культивирования.

На фиг. 4, включающей фиг. 3А и 3В, показано получение IFN $\gamma$ , IL-2 и TNF $\alpha$  посредством электропорированных Т-клеток CAR после 16 ч совместного культивирования с указанными целевыми клеточными линиями.

На фиг. 5 показана экспрессия CAR в трансфицированных лентивирусом первичных человеческих Т-клетках от двух здоровых доноров.

На фиг. 6 показана средняя цитолитическая активность с течением времени от двух здоровых доноров, экспрессирующих указанные CAR, совместно культивированные с различными целевыми клеточными линиями.

На фиг. 7, включающей фиг. 7А, 7В и 7С, показано получение IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  и IL-2 посредством трансфицированных лентивирусом человеческих Т-клеток CAR от двух здоровых доноров после 16 ч совместного культивирования с указанными целевыми клеточными линиями.

На фиг. 8 показана пролиферация CFSE-меченных трансфицированных лентивирусом Т-клеток CAR от двух здоровых доноров после 5 дней совместного культивирования с гранулами CD3-CD28 или указанными целевыми клеточными линиями.

На фиг. 9 показана экспрессия CAR в трансфицированных лентивирусом первичных человеческих Т-клетках, пригодных для исследований *in vivo*.

На фиг. 10 показана биолюминесцентная визуализация меченных клеток острого миелоидного лейкоза после внутривенной инъекции Т-клеток CAR в ксенотенной модели.

На фиг. 11 показаны кривые выживаемости мышей, которым инъецировали Т-клетки CAR.

На фиг. 12 показана векторная диаграмма pGAR.

### Подробное описание изобретения

Следует понимать, что химерные антигенные рецепторы (CAR или CAR-T) и Т-клеточные рецепторы (TCR) являются созданными методами генетической инженерии рецепторами. Данные разработанные рецепторы могут быть легко введены внутрь и экспрессированы иммунными клетками, в том числе Т-клеток, в соответствии с методиками, известными в данной области. С помощью CAR один рецептор может быть запрограммирован как на распознавание специфического антигена, так и при связывании с данным антигеном на активацию иммунной клетки для поражения и разрушения клетки, несущей данный антиген. Если данные антигены существуют на клетках опухоли, то иммунная клетка, которая экспрессирует CAR, может нацеливаться и уничтожать клетку опухоли.

CAR могут быть разработаны для связывания с антигеном (например, антиген клеточной поверхности) посредством введения антигенсвязывающей молекулы, которая взаимодействует с данным целевым антигеном. Предпочтительно антигенсвязывающая молекула представляет собой ее фрагмент антитела и, более предпочтительно, один или несколько одноцепочечных фрагментов антитела ("scFv"). scFv представляет собой одноцепочечный фрагмент антитела, имеющий вариабельные области тяжелых и легких цепей антитела, связанных вместе. См. патенты США №№ 7741465 и 6319494, а также Eshhar et al., *Cancer Immunol Immunotherapy* (1997) 45: 131-136. scFv сохраняет способность исходного антитела к специфическому взаимодействию с целевым антигеном. scFv являются предпочтительными для применения в химерных антигенных рецепторах, поскольку они могут быть разработаны, с возможностью экспрессироваться в качестве части одной цепи вместе с другими компонентами CAR. Id. См. также Krause et al., *J. Exp. Med.*, изд. 188, No. 4, 1998 (619-626); Finney et al., *Journal of Immunology*, 1998, 161: 2791-2797. Следует понимать, что антигенсвязывающая молекула обычно содержится внутри внеклеточной части CAR, так что она способна распознавать и связываться с антигеном, представляющим интерес. Биспецифичные и мультиспецифичные CAR рассматриваются в объеме настоящего изобретения со специфичностью к более чем одной цели, представляющей интерес.

### Костимулирующие домены

Химерные антигенные рецепторы могут вводить костимулирующие (сигнализирующие) домены для повышения их силы. См. Патенты США №№ 7741465 и 6319494, а также Krause et al. и Finney et al. (выше), Song et al., *Blood* 119:696-706 (2012); Kalos et al., *Sci Transl. Med.* 3:95 (2011); Porter et al., *N. Engl. J. Med.* 365:725-33 (2011), и Gross et al., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 56:59-83 (2016). Например, CD28 представляет собой костимулирующий белок, в естественных условиях находящийся на Т-клетках. Полная исходная аминокислотная последовательность CD28 описана в иллюстративной последовательности NCBI: NP\_006130.1. Полная исходная последовательность нуклеиновой кислоты CD28 описана в NCBI Reference Sequence: NM\_006139.1.

Определенные домены CD28 применялись в химерных антигенных рецепторах. В соответствии с

настоящим изобретением, в настоящее время было обнаружено, что новый внеклеточный домен CD28, называемый "CD28T", неожиданно обеспечивает определенные преимущества при использовании в конструкции CAR.

Нуклеотидная последовательность молекулы CD28T, в том числе внеклеточный домен CD28T, и трансмембранный и внутриклеточный домены CD28 перечислены в SEQ ID NO: 1:

CTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAACAATCATTACACGTGAAGGGCAA  
GCACCTCTGTCCGTACCCTTGTCCCTGGTCCATCCAAGCCATTCTGGGTGTTGGTC  
GTAGTGGGTGGAGTCCCTCGCTTGTACTCTCTGCTCGTACCCTGGCTTTTATAATCT  
TCTGGGTTAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTC  
CACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGAT  
TTCGCTGCCTATCGGAGC

Соответствующая аминокислотная последовательность перечислена в SEQ ID NO: 2:

LDNEKSNGTIHVKGKHLCP SPLFPGPSKP  
AFIIFWVRSK RSRLHSDYM NMTPRRPGPT RKHYQPYAPP RDFAAAYRS

Нуклеотидная последовательность внеклеточной части CD28T перечислен в SEQ ID NO: 3:

CTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAACAATCATTACGTGAAGGGCAA  
GCACCTCTGTCCGTACCCTTGTCCCTGGTCCATCCAAGCCA

Соответствующая аминокислотная последовательность внеклеточного домена CD28T перечислена в SEQ ID NO: 4:

LDNEKSNGTI HVKGKHLCP SPLFPGPSKP

Нуклеотидная последовательность трансмембранного домена CD28 перечислена в SEQ ID NO: 5:

TTCTGGGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGAGTCCCTCGCTGTTACTCTCTGCT  
TCGTCACCGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTT

Аминокислотная последовательность трансмембранного домена CD28 перечислена в SEQ ID NO: 6:

FWVLVVGGV LACYSLLVTV AFIIFWV

Нуклеотидная последовательность внутриклеточного сигнализирующего домена CD28 перечислена в SEQ ID NO: 7:

AGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACT  
CCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGA  
TTCGCTGCCTATCGGAGC

Аминокислотная последовательность внутриклеточного сигнализирующего домена CD28 перечислена в SEQ ID NO: 8:

RSKRSRLHSDYMNMTTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAAYRS

Дополнительные последовательности CD28, пригодные для применения в настоящем изобретении, включают нуклеотидную последовательность CD28, перечисленную в SEQ ID NO: 11:

ATTGAGGTGATGTATCCACCGCCTTACCTGGATAACGAAAAGAGTAAC  
GGTACCATCATTACCGTGAAGGTAACACCTGTGTCCTTCTCCCTCTTCCCCGGG  
CCATCAAAGCCC

Соответствующая аминокислотная последовательность перечислена в SEQ ID NO: 12:

IEVMYPPPYLDNEKSNGTIHVKGKHLCP SPLFPGPSKP

Другие пригодные внеклеточные или трансмембранные последовательности могут быть образованы из CD8. Нуклеотидная последовательность пригодного внеклеточного и трансмембранного домена CD8 перечислена в SEQ ID NO: 13:

GCTGCAGCATTGAGCAAACATAAATGATTTTGTACCTTTGTACCA  
GTGTTCTTGCCGGCTAAGCCTACTACCACACCCGCTCCACGGCCACCTACCCAGCT  
CCTACCATCGCTTACAGCCTCTGTCCCTGCGCCAGAGGCTTGCCGACCGGCCGA  
GGGGCGCTGTTCATACCAGAGGACTGGATTTCGCCTGCGATATCTATATCTGGGCA  
CCCCTGGCCGGAACCTGCGGCTACTCCTGCTGTCCCTGGTATCACGCTCTATTGT  
AATCAGGAAC

Соответствующая аминокислотная последовательность перечислена в SEQ ID NO: 14:

AAALSNSIMYFSHFVFLPAKPTTTPAPRPPTPARTIASQPLSLRPEACRP  
AAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLSLVITLYCNHRN

Пригодные костимулирующие домены, входящие в объем настоящего изобретения, могут быть получены, помимо других источников, из CD28, CD28T, OX40, 4-1BB/CD137, CD2, CD3 (альфа, бета, дельта, эпсилон, гамма, дзета), CD4, CD5, CD7, CD9, CD16, CD22, CD27, CD30, CD33, CD37, CD40, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, PD-1, ICOS, связанный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1 (CD11a/CD18), CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT (член надсемейства факторов некроза опухоли 14; TNFSF14), NKG2C, Ig альфа (CD79a), DAP-10, Fc гамма рецептор, молекула MHC класса I, TNF, TNF $\alpha$ , интегрин, сигнальная молекула активации лимфоцитов, BTLA, рецептор к Толл-лигандам, ICAM-1, B7-H3, CD80, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRP1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$ , IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R альфа, ITGA4, VLA1,

CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDI-Id, ITGAE, CD103, ITGAL, CDI-Ia, LFA-1, ITGAM, CDI-Ib, ITGAX, CDI-Ic, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, CD83 лиганд, или их фрагменты или комбинации.

#### Активирующие домены

CD3 является элементом Т-клеточного рецептора на исходной Т-клетки, и, как было показано, представляет собой важный внутриклеточный активирующий элемент в CAR. В предпочтительном варианте осуществления CD3 представляет собой CD3 дзета, нуклеотидная последовательность которого перечислена в SEQ ID NO: 9:

```
AGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGC
CAGAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTT
GGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAAC
CCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTC
TGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTAC
CAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTG
CCACCTAGG
```

Соответствующая аминокислота внутриклеточного CD3 дзета перечислена в SEQ ID NO: 10:

```
RVKFSRSADAPAYQQGQNLNLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPEMGGK
```

PR

```
RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGLYQGLSTATKDTYDALHM
```

QALPPR

#### Ориентация домена

Следует понимать, что структурно данные домены соответствуют локациям, соответствующим иммунным клеткам. Таким образом, данные домены могут представлять собой часть (i) "шарнирного" или внеклеточного (EC) домена (EC), (ii) трансмембранного (TM) домена и/или (iii) внутриклеточного (цитоплазматического) домена (IC). Внутриклеточный компонент зачастую содержит часть члена семейства CD3, предпочтительно CD3 дзета, которая способна активировать Т-клетку при связывании антигенсвязывающей молекулы с ее мишенью. В одном варианте осуществления шарнирный домен обычно состоит по меньшей мере из одного костимулирующего домена, как указано в данном документе.

Следует также понимать, что шарнирная область также может содержать несколько или все члены семейства иммуноглобулинов, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE, IgM или их фрагменты.

Иллюстративные конструкции CAR в соответствии с настоящим изобретением перечислены в табл. 1.

Таблица 1

Название конструкции	scFv	Костимулирующий домен	Активирующий домен
24C1 CD28T	24C1	CD28T	CD3 дзета
24C1 CD28	24C1	CD28	CD3 дзета
24C1 CD8	24C1	CD8	CD3 дзета
24C8 CD28T	24C8	CD28T	CD3 дзета
24C8 CD28	24C8	CD28	CD3 дзета
24C8 CD8	24C8	CD8	CD3 дзета
20C5.1 CD28T	20C5.1	CD28T	CD3 дзета
20C5.1 CD28	20C5.1	CD28	CD3 дзета
20C5.1 CD8	20C5.1	CD8	CD3 дзета
20C5.2 CD28T	20C5.2	CD28T	CD3 дзета
20C5.2 CD28	20C5.2	CD28	CD3 дзета
20C5.2 CD8	20C5.2	CD8	CD3 дзета

#### Домены, относящиеся к клетке

Следует понимать, что относительно клетки, несущей рецептор, разработанные Т-клетки по настоящему изобретению содержат антигенсвязывающую молекулу (например, scFv), внеклеточный домен (который может содержать "шарнирный" домен), трансмембранный домен и внутриклеточный домен. Внутриклеточный домен содержит по меньшей мере в части активирующего домена, предпочтительно состоит из членов семейства CD3, например, CD3 дзета, CD3 эILON, CD3 ГАММА или их частей. Следует

также понимать, что антигенсвязывающая молекула (например, один или несколько scFv) разработана таким образом, что она расположена во внеклеточной части молекулы/конструкции, так что она способна распознавать и связываться с ее мишенью или мишенями.

#### **Внеклеточный домен**

Внеклеточный домен является положительным для сигнализирования и для эффективного ответа лимфоцитов на антиген. Внеклеточные домены для конкретного применения согласно настоящему изобретению могут быть образованы из (т.е. состоять из) CD28, CD28T, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, programmed death-1 (PD-1), индуцируемого костимулятора Т-клеток (ICOS), связанного с функцией лимфоцитов антигена-1 (LFA-1, CD1-1a/CD18), CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig альфа (CD79a), DAP-10, Fc гамма рецептора, молекулы МНС класса 1, TNF рецепторных белков, белка иммуноглобулина, рецептора к цитокинам, интегринов, сигнальных молекул активации лимфоцитов (белков SLAM), активирующих рецепторов НК-клеток, BTLA, рецептора к Толл-лигандам, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8 альфа, CD8 бета, IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, лиганда, который специфично связывается с CD83, или любых их комбинаций. Внеклеточный домен может быть образован либо из природного, либо из синтетического источника.

Как описано в данном документе, внеклеточные домены зачастую содержат шарнирную область. Она представляет собой часть внеклеточного домена, иногда называемая "спейсерной" областью. В соответствии с настоящим изобретением может использоваться разнообразие шарниров, в том числе костимулирующие молекулы, как обсуждалось выше, а также последовательности иммуноглобулина (Ig) или другие пригодные молекулы, для достижения необходимого пространственного расстояния от клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления вся внеклеточная область содержит шарнирную область. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область содержит CD28T или домен EC CD28.

#### **Трансмембранный домен**

CAR может быть сконструирован с возможностью включения в себя трансмембранного домена, который конденсирован до внеклеточного домена CAR. Он может подобным образом быть конденсирован до внутриклеточного домена CAR. В одном варианте осуществления применяют трансмембранный домен, который в естественных условиях связан с одним из доменов в CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен может быть выбран из или модифицирован посредством аминокислотного замещения во избежание связывания таких доменов с их трансмембранными доменами или различными белками поверхностной мембраны для сведения к минимуму взаимодействий с другими членами комплекса рецепторов. Трансмембранный домен может быть получен либо из природного, либо из синтетического источника. Если источник является природным, то домен может быть образован из любого связанного с мембраной или трансмембранного белка. Трансмембранные области для конкретного применения согласно настоящему изобретению могут быть образованы из (т.е. состоять из) CD28, CD28T, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, programmed death-1 (PD-1), индуцируемого костимулятора Т-клеток (ICOS), связанного с функцией лимфоцитов антигена-1 (LFA-1, CD1-1a/CD18), CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig альфа (CD79a), DAP-10, Fc гамма рецептора, молекулы МНС класса 1, TNF рецепторных белков, белка иммуноглобулина, рецептора к цитокинам, интегринов, сигнальных молекул активации лимфоцитов (белков SLAM), активирующих рецепторов НК-клеток, BTLA, рецептора к Толл-лигандам, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8 альфа, CD8 бета, IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, лиганда, который специфично связывается с CD83, или любых их комбинаций.

Необязательно, короткие линкеры могут образовывать связи между любыми или некоторыми внеклеточными, трансмембранным и внутриклеточными доменами CAR.

В одном варианте осуществления трансмембранный домен в CAR по настоящему изобретению представляет собой трансмембранный домен CD8. В другом варианте осуществления трансмембранный домен CD8 содержит трансмембранную часть последовательности нуклеиновой кислоты в SEQ ID NO: 13. В другом варианте осуществления трансмембранный домен CD8 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует трансмембранную аминокислотную последовательность, содержа-

щуюся в SEQ ID NO: 14.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен в CAR по настоящему изобретению представляет собой трансмембранный домен CD28. В одном варианте осуществления трансмембранный домен CD28 содержит последовательность нуклеиновой кислоты в SEQ ID NO: 5. В одном варианте осуществления трансмембранный домен CD28 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность в SEQ ID NO: 6. В другом варианте осуществления трансмембранный домен CD28 содержит аминокислотную последовательность в SEQ ID NO: 6.

#### **Внутриклеточный (цитоплазматический) домен**

Внутриклеточный (цитоплазматический) домен разработанных Т-клеток по настоящему изобретению может обеспечивать активацию по меньшей мере одной из нормальных эффекторных функций иммунной клетки. Эффекторная функция Т-клетки, например, может представлять собой цитолитическую активность или хелперную активность, в том числе секрецию цитокинов.

Следует понимать, что пригодные внутриклеточные молекулы включают (т.е. содержат) без ограничения CD28, CD28T, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, programmed death-1 (PD-1), индуцируемого костимулятора Т-клеток (ICOS), связанного с функцией лимфоцитов антигена-1 (LFA-1, CD1-1a/CD18), CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig альфа (CD79a), DAP-10, Fc гамма рецептора, молекулы MHC класса 1, TNF рецепторных белков, белка иммуноглобулина, рецептора к цитокинам, интегринов, сигнальных молекул активации лимфоцитов (белков SLAM), активирующих рецепторов NK-клеток, BTLA, рецептора к Толл-лигандам, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GATR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8 альфа, CD8 бета, IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, лиганда, который специфично связывается с CD83, или любых их комбинаций.

В предпочтительном варианте осуществления цитоплазматический домен CAR может быть сконструирован с возможностью включения в себя сигнализирующего домена CD3 дзета, самого по себе или соединенного с любым другим необходимым цитоплазматическим доменом(доменами), пригодного в контексте CAR по настоящему изобретению. Например, цитоплазматический домен CAR может содержать часть цепи CD3 дзета и костимулирующую сигнализирующую область.

Цитоплазматические сигнализирующие последовательности в цитоплазматической сигнализирующей части CAR по настоящему изобретению могут быть связаны между собой в случайном или определенном порядке.

В одном предпочтительном варианте осуществления цитоплазматический домен предназначен для включения в себя сигнализирующего домена CD3 дзета и сигнализирующего домена CD28. В другом варианте осуществления цитоплазматический домен предназначен для включения в себя сигнализирующего домена CD3 дзета и сигнализирующего домена 4-1BB. В другом варианте осуществления цитоплазматический домен в CAR по настоящему изобретению предназначен для включения в себя части CD28 и CD3 дзета, при этом цитоплазматическая CD28 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, перечисленную в SEQ ID NO: 7 и аминокислотную последовательность, перечисленную в SEQ ID NO: 8. Последовательность нуклеиновой кислоты CD3 дзета перечислена в SEQ ID NO: 9, и аминокислотная последовательность перечислена в SEQ ID NO: 8.

Следует понимать, что одна предпочтительная ориентация CAR в соответствии с настоящим изобретением содержит антигенсвязывающий домен (например, scFv) совместно с костимулирующим доменом и активирующим доменом. Костимулирующий домен может содержать одну или несколько внеклеточных частей, трансмембранную часть и внутриклеточную часть. Следует также понимать, что несколько костимулирующих доменов могут использоваться совместно.

В некоторых вариантах осуществления представлены нуклеиновые кислоты, содержащие промотор, функционально связанный с первым полинуклеотидом, кодирующим антигенсвязывающую молекулу, по меньшей мере одну костимулирующую молекулу и активирующий домен.

В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты содержится внутри вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор выбран из группы, включающей ретровирусные векторы, векторы вируса лейкемии мышей, векторы SFG, аденовирусные векторы, лентивирусные векторы, векторы адено-ассоциированного вируса (AAV), векторы вируса герпеса и вектор вируса осповакцины. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержится внутри плазмиды. Настоящее изобретение дополнительно относится к выделенным полинуклеотидам, кодирующим химерные антигенные рецепторы, и векторам, содержащим полинуклеотиды. Любой вектор, известный в данной области, может быть пригоден для настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой ретровирусный вектор (например, pMSVg1), вектор ДНК, вектор вируса лейке-

мии мышей, вектор SFG, плазмид, вектор РНК, аденовирусный вектор, бакуловирусный вектор, вектор вируса Эпштейна-Барр, вектор паповавируса, вектор вируса осповакцины, вектор вируса простого герпеса, вектор адено-ассоциированного вируса (AAV), лентивирусный вектор (например, рGAR) или любые их комбинации. Карта вектора рGAR показана на фиг. 12. Последовательность рGAR является следующей:

```

CTGACGCGCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGC
GTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTCCT
TTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTAGG
GTTCCGATTTAGTGCTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGG
TTCACGTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTGACGTTGGAGTC
CACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTC
GGTCTATTCTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTGGCCTATTGGTTAAAAAAT
GAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGGAATTTAACAAAAATTTAACGCTTACAATT
TGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCT
TCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGT
AACGCCAGGGTTTTCCAGTACGACGTTGTAACGACGGCCAGTGAATTGTAAT
ACGACTACTATAGGGCGACCCGGGGATGGCGCGCCAGTAATCAATTACGGGGTCA
TTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTCCGCGTTACATAACTACGGTAAATGGCCCG
CCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCC
ATAGTAAACCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAA
ACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGAC
GTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGAC
TTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGTGATGCGGT
TTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTC
TCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTGTTTTGGCACCAAAAATCAACGGGACTTTC
CAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGGTACGG
TGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGGGTCTCTCTGGTTAGACC
AGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAAGCCTCAAT
AAAGCTTGCCTTGAGTGTCTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTA
ACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCC
GAACAGGGACTTGAAAGCGAAAAGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACT
CGGCTTGCTGAAGCGGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCC
AAAAATTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGT
ATTAAGCGGGGAGAAATTAGATCGCGATGGGAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGG
GAAAGAAAAAATATAAATTAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACG
ATTTCGACGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAAATCAGAAGGCTGTAGACAAACTGG
GACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAAGCTTAGATCATTATATAAT
ACAGTAGCAACCCCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGA
AGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGACCACCGCACAGCAA
GCCCGCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTG
AATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAG
GCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGT
TCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTG
ACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGTGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCT
GAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGC
AGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTG
GGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAATCATTGACCACCTGTGTGCTTGGAAATGCT
AGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTGGATGGAGTG
GGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAATCGC
AAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAG
TTTGTGGAATTGGTTAACATAACAAATTTGGCTGTGGTATATAAATTTATCATAAT
GATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTAAGAATAGTTTTTGTGCTGACTTTCTATAGTGAA
TAGAGTTAGGCAGGGATATTACCATTATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGAG

```

GGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGA  
CAGATCCATTTCGATTAGTGAACGGATCTCGACGGTATCGGTAACTTTTAAAAGAAA  
AGGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACA  
GACATACAAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAATTCAAAATTTTATCGCG  
ATCGCGGAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCA  
TTTTGCAAGGCATGAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTTA  
GGAACAGAGAGACAGCAGAATATGGGCCAAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCC  
TGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCAGATGCGGTCCC GCCCTCAGCA  
GTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCAAGGACCTGAAAATGACCCCT  
GTGCCATTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTCTGC  
TCCCCGAGCTCAATAAAAAGAGCCACAAACCCCTCACTCGGCGGCCAGTCTTCGAA  
GTAGATCTTTGTGATCCTACCATCCACTCGACACACCCGCCAGCGGCCGCTGCCAA  
GCTTCCGAGCTCTCGAATTAATTCACGGTACCCACCATGGCCTAGGGAGACTAGTCG  
AATCGATATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAAC  
TATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTAATGCCTTTGTATCATGCTA  
TTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCTGTATAAATCCTGGTTGTGTCTCTT  
TATGAGGAGTTGTGGCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCT  
GACGCAACCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGTCTCCTTCCGGGACT  
TTCGCTTTCCTTCCCTATTGCCACGGCGGAACATCGCCGCTGCCTTGCCCGCT  
GCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGCACTGACAATCCGTGGTGTGTCGGGGAAG  
CTGACGTCCTTTTCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGT  
CCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCTTCCCGCGGCCGTCT  
GCCGGCTCTGCGGCCCTTTCGCGCTTTCGCCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCC  
CTTTGGGCCGCTCCCCGCTGGTTAATTAAGTACCTTTAAGACCAATGACTTACA  
AGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCGA  
ATTCCTCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTGTGTTGACTGGGTCTCTCTGGTTAG  
ACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAAACCACTGCTTAAGCCTC  
AATAAAGCTTGCCCTGAGTGCTCAAGTAGTGTGTGCCGCTGTTGTGTGACTCTG  
GTAAGTAGAGATCCCTCAGACCTTTTAGTCAGTGTGAAAATCTCTAGCAGGCATG  
CCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTG  
AAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTATTTGTAACCATTATA  
AGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTATGTTTCAGGTTTCAG  
GGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTGGCGGCCATCGTCGAGGTTCCCTTATGAGGGT  
TAATTGCGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTTGTTATCC  
GCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTG

CCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGT  
 CGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGC  
 GGTTCGCTATTGGGCGCTCTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGTGCCTCGGTGTC  
 TTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGCGGTAATACGGTTATCCACA  
 GAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCA  
 GGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACG  
 AGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAACCCGACAGGACTATAA  
 AGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCCTG  
 CCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATA  
 GCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTG  
 TGCACGAACCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTG  
 AGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGG  
 ATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTGAAGTGGTGGCCTAA  
 CTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTAC  
 CTTCGAAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAACAACCAACCGCTGGTAGCG  
 GTGGTTTTTTTGTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAA  
 GATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAA  
 GGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA  
 AATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTAC  
 CAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTCGTTTCATCCATAG  
 TTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCC  
 CCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAA  
 TAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCC  
 TCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAAT  
 AGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTT  
 GGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCC  
 ATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAG  
 TTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCA  
 TGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTCAACCAAGTCATTCTGAG  
 AATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAATACCG  
 CGCCACATAGCAGAACTTAAAAAGTGCTCATATTGAAAAACGTTCTTCGGGGCGA  
 AAACCTCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCA  
 CCCAACTGATCTTCAGCATCTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACA  
 GGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATAC  
 TCATACTCTTCTTTTCAATATTATGAAGCATTATCAGGGTATTGTCTCATGAG  
 CGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAAGGGGTTCCGCGCACATT  
 TCCCCGAAAAGTGCCAC (SEQ ID NO: 95)

Дополнительные пригодные иллюстрационные векторы включают, например, pBABE-puro, pBABE-neo largeTcDNA, pBABE-hygro-hTERT, pMKO.1 GFP, MSCV-IRES-GFP, pMSCV PIG (Puro IRES GFP пустую плазмиду), pMSCV-loxp-dsRed-loxp-eGFP-Puro-WPRE, MSCV IRES люциферазу, pMIG, MDH1-PGK-GFP\_2.0, TiRMPVIR, pMSCV-IRES-mCherry FP, pRetroX GFP T2A Cre, pRXTN, pLucEXP, и pLXIN-Luc.

В некоторых вариантах осуществления разработанная иммунная клетка представляет собой Т-клетку, проникающий в опухоль лимфоцит (TIL), NK-клетку, TCR-экспрессирующую клетку, дендритную клетку или NK-T-клетку. В некоторых вариантах осуществления клетку получают или изготавливают из периферической крови. В некоторых вариантах осуществления клетку получают или изготавливают из мононуклеарных клеток (PBMC) периферической крови. В некоторых вариантах осуществления клетку получают или изготавливают из костного мозга. В некоторых вариантах осуществления клетку получают или изготавливают из пуповинной крови. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой человеческую клетку. В некоторых вариантах осуществления трансфицирована или преобразована вектором нуклеиновой кислоты с использованием способа, выбранного из группы, включающей электропорацию, сонопорацию, биолистику (например, генетическая пушка), липидную трансфекцию, полимерную трансфекцию, наночастицы или полиплексы.

В некоторых вариантах осуществления химерные антигенные рецепторы экспрессируются в разработанных иммунных клетках, которые содержат нуклеиновые кислоты по настоящей заявке. Данные химерные антигенные рецепторы по настоящей заявке в некоторых вариантах осуществления могут содер-

жать (i) антигенсвязывающую молекулу (например, scFv), (ii) трансмембранную область и (iii) T-клеточную активирующую молекулу или область.

#### **Антигенсвязывающие молекулы**

Антигенсвязывающие молекулы входят в объем настоящего изобретения.

Применяемая в данном документе "антигенсвязывающая молекула" означает любой белок, который связывается с указанным целевым антигеном. В настоящей заявке указанный целевой антиген представляет собой белок FLT3 или его фрагмент. Антигенсвязывающие молекулы включают без ограничения антитела и его связывающие части, например, иммунологически функциональные фрагменты. Пептидные антитела (т.е. Fc конденсированные молекулы, содержащие связывающиеся с пептидами домены) представляют собой другие примеры пригодных антигенсвязывающих молекул.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула связывается с антигеном на клетке опухоли. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула связывается с антигеном на клетке, вовлеченной в гиперпролиферативное заболевание, или с вирусным или бактериальным антигеном. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула связывается с FLT3. В следующих вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело или его фрагмент, в том числе одну или несколько его определяющих комплементарность областей (CDR). В следующих вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула представляет собой вариабельный фрагмент с единственной цепью (scFv).

Термин "иммунологически функциональный фрагмент" (или "фрагмент") антигенсвязывающей молекулы переставляет собой вид антигенсвязывающей молекулы, содержащей часть (независимо от того, каким образом данная часть получена или синтезирована) антитела, в которой отсутствует по меньшей мере несколько аминокислот, присутствующих в полноразмерной цепи, но которые все еще способны к специфичному связыванию с антигеном. Такие фрагменты биологически активны в том, что они связываются с антигеном-мишенью и могут завершаться другими антигенсвязывающими молекулами, в том числе интактных антител, для связывания с указанным эпитопом. В некоторых вариантах осуществления фрагменты представляют собой нейтрализующие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления фрагменты могут блокировать или снижать активность FLT3. В одном аспекте такой фрагмент будет сохранять по меньшей мере одна CDR, присутствующий в полноразмерной легкой или тяжелой цепи, и в некоторых вариантах осуществления будет содержать единственную тяжелую и/или легкую цепь или ее часть. Данные фрагменты могут быть получены посредством методик рекомбинантной ДНК, или могут быть получены посредством ферментативного или химического отщепления антигенсвязывающих молекул, в том числе интактных антител.

Иммунологически функциональные фрагменты включают без ограничения фрагменты scFv, фрагменты Fab (Fab', F(ab')<sub>2</sub> и т.п.), одна или несколько CDR, антитела (вариабельный домен тяжелой цепи на том же полипептиде, что и вариабельный домен легкой цепи, соединенные посредством короткого пептидного линкера, который слишком короткий для обеспечения объединения между двумя доменами той же цепи), доменные антитела и антитела с единственной цепью. Данные фрагменты могут быть получены из любого источника, относящегося к млекопитающим, в том числе без ограничения человека, мыши, крысы, верблюда или кролика. Как будет понятно специалисту в данной области, антигенсвязывающая молекула может включать компоненты, не являющиеся белковыми.

Варианты антигенсвязывающих молекул также входят в объем настоящего изобретения, например вариабельная область легкой цепи и/или вариабельная область тяжелой цепи, каждая из которых по меньшей мере на 70-80%, на 80-85%, на 85-90%, на 90-95%, на 95-97%, на 97-99% или более чем на 99% идентична аминокислотным последовательностям последовательностей, описанных в данном документе. В некоторых случаях такие молекулы включают по меньшей мере одну тяжелую цепь и одну легкую цепь, тогда как в других случаях варианты формы содержат две идентичные легкие цепи и две идентичные тяжелые цепи (или их подчасти). Специалист в данной области легко определит пригодные варианты антигенсвязывающих молекул и использованием хорошо известных методик, как указано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления специалист в данной области сможет определить пригодные области молекулы, которые могут быть изменены без разрушения активности посредством нацеленных областей, которые не считаются важными для активности.

В некоторых вариантах осуществления полипептидная структура антигенсвязывающих молекул основана на антителах, в том числе без ограничения моноклональных антителах, биспецифических антителах, миниантителах, доменных антителах, синтетических антителах (иногда называемых в данном документе "миметиками антител"), химерных антителах, гуманизированных антителах, человеческих антителах, слияниях антител (иногда называемых в данном документе "конъюгатами антител"), и их фрагментах, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула содержит или состоит из авимеров.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающую молекулу для FLT3 вводят отдельно. В других вариантах осуществления антигенсвязывающую молекулу для FLT3 вводят в виде части CAR, TCR или другой иммунной клетки. В таких иммунных клетках антигенсвязывающая молекула для FLT3 может быть под контролем той же промоторной области или отдельного промотора. В некоторых вари-

антах осуществления кодирующие гены белковые средства и/или антигенсвязывающая молекула для FLT3 могут быть в отдельных векторах.

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает фармацевтические композиции, содержащие антигенсвязывающую молекулу для FLT3 вместе с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем, растворителем, эмульгатором, консервантом и/или вспомогательным средством. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции будут включать более одной отличной антигенсвязывающей молекулы для FLT3. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции будут включать более одной антигенсвязывающей молекулы для FLT3, где антигенсвязывающие молекулы для FLT3 связываются более чем с одним эпитопом. В некоторых вариантах осуществления различные антигенсвязывающие молекулы не будут конкурировать друг с другом за связывание с FLT3.

В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция может быть выбрана для парентеральной доставки, для ингаляции или для доставки через желудочно-кишечный тракт, например перорально. Получение таких фармацевтически приемлемых композиций входит в компетенцию специалиста в данной области. В некоторых вариантах осуществления для поддержания физиологического pH или незначительно более низкого pH композиции применяют буферы, обычно внутри диапазона pH от приблизительно 5 до приблизительно 8. В некоторых вариантах осуществления, если рассматривается парентеральное введение, то терапевтическая композиция может быть в форме апиrogenного, парентерально-приемлемого водного раствора, содержащего необходимую антигенсвязывающую молекулу для FLT3, с дополнительными терапевтическими средствами или без них, в фармацевтически приемлемой среде. В некоторых вариантах осуществления среда для парентеральной инъекции представляет собой стерильную дистиллированную воду, в которой антигенсвязывающая молекула для FLT3, по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством или без него, составлена в виде стерильного изотонического раствора, сохраненного должным образом. В некоторых вариантах осуществления получение может включать составление необходимой молекулы с полимерными соединениями (такими как полимолочная кислота или полигликолиевая кислота), гранулами или липосомами, которые могут обеспечивать контролируемое или замедленное высвобождение продукта, который затем может быть доставлен посредством инъекции вещества замедленного всасывания. В некоторых вариантах осуществления для введения необходимой молекулы могут применяться имплантируемые устройства для доставки лекарственных средств.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула применяется в качестве диагностического инструмента или инструмента для подтверждения. Антигенсвязывающая молекула может применяться для исследования количества FLT3, присутствующего в образце и/или у субъекта. В некоторых вариантах осуществления диагностическая антигенсвязывающая молекула не является нейтрализующей. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие молекулы, раскрытые в данном документе, применяются или представлены в наборе для исследования и/или способе определения FLT3 в тканях или клетках млекопитающего с целью контроля/диагностики заболевания или нарушения, связанных с изменениями уровней FLT3. Набор может включать антигенсвязывающую молекулу, которая связывается с FLT3, вместе со средствами для определения связывания антигенсвязывающей молекулы с FLT3, при наличии, и необязательно белковых уровней FLT3.

Антигенсвязывающая молекула будет дополнительно понятна с учетом определений и описаний ниже.

Область "Fc" содержит два фрагмента с тяжелой цепью, содержащие домены CH1 и CH2 антитела. Два фрагмента с тяжелой цепью удерживаются вместе посредством двух или более дисульфидных связей и посредством гидрофобных взаимодействий доменов CH3.

"Фрагмент Fab" содержит одну легкую цепь, CH1 и переменные области одной тяжелой цепи. Одна тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать дисульфидную связь с другой молекулой с тяжелой цепью. "Фрагмент Fab" содержит одну легкую цепь и часть одной тяжелой цепи, которая содержит домен VH и домен CH1, а также область между доменами CH1 и CH2, так что дисульфидная связь между цепями может быть образована между двумя тяжелыми цепями двух фрагментов Fab' с образованием молекулы F(ab')<sub>2</sub>. "Фрагмент F(ab')<sub>2</sub>" содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, содержащие часть постоянной области между доменами CH1 и CH2, так что дисульфидная связь между цепями образована между двумя тяжелыми цепями. Фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, составленный, таким образом, из двух фрагментов Fab', которые удерживаются вместе посредством дисульфидной связи между двумя тяжелыми цепями.

"Область Fv" содержит переменные области как из тяжелой, так и из легкой цепей, но не содержит постоянных областей.

"Переменный фрагмент одной цепи" ("scFv", также называемый "антителом с единственной цепью") относится к молекулам Fv, в которых переменные области тяжелой и легкой цепей были соединены посредством гибкого линкера с образованием единственной полипептидной цепи, которая образует антигенсвязывающую область. См. заявку PCT WO 88/01649 и патенты США №№ 4946778 и 5260203, раскрытия которых включены посредством ссылки во всей своей полноте.

"Двухвалентная антигенсвязывающая молекула" содержит две антигенсвязывающие области. В не-

которых случаях две связывающие области обладают теми же антигенными специфичностями. Двухвалентные антигенсвязывающие молекулы могут быть биспецифическими. "Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула" представляет собой молекулу, которая нацеливается более чем на один антиген или эпитоп. "Биспецифическая", "с двойной специфичностью" или "бифункциональная" антигенсвязывающая молекула представляет собой гибридную антигенсвязывающую молекулу или антитело, соответственно, с двумя различными антигенсвязывающими областями. Две связывающие области биспецифической антигенсвязывающей молекулы будут связываться с двумя различными эпитопами, которые могут находиться на одних и тех же или различных мишенях белка.

Как сообщается, антигенсвязывающая молекула "специфически связывает" ее антиген-мишень, если константа диссоциации ( $K_d$ ) составляет  $\sim 1 \times 10^{-7}$  М. Антигенсвязывающая молекула специфически связывается с антигеном, имеющим "высокую аффинность", если  $K_d$  составляет  $1-5 \times 10^{-9}$  М, и имеющим "крайне высокую аффинность", если  $K_d$  составляет  $1-5 \times 10^{-10}$  М. В одном варианте осуществления антигенсвязывающая молекула характеризуется  $K_d$ , равной  $10^{-9}$  М. В другом варианте осуществления скорость диссоциации составляет  $< 1 \times 10^{-5}$ . В других вариантах осуществления антигенсвязывающие молекулы будут связываться с человеческим FLT3 при  $K_d$  от приблизительно  $10^{-7}$  М до  $10^{-13}$  М, и в еще одном варианте осуществления антигенсвязывающие молекулы будут связываться при  $K_d$   $1,0-5 \times 10^{-10}$ .

Как сообщается, антигенсвязывающая молекула является "селективной", если она связывается с одной мишенью более прочно, чем она связывается со второй мишенью.

Термин "антитело" относится к интактному иммуноглобулину любого изотипа или его фрагменту, который может конкурировать с интактным антителом за специфическое связывание с антигеном-мишенью, и включает, например, химерные, гуманизированные, полностью человеческие и биспецифические антитела. "Антитело" представляет собой вид антигенсвязывающей молекулы, описанной в данном документе. Интактное антитело, как правило, будет содержать по меньшей мере две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи, но в некоторых случаях может включать меньшее количество цепей, например, антитела, в естественных условиях встречающиеся у верблюжьих, которые могут содержать только тяжелые цепи. Антитела могут быть образованы исключительно из одного источника, или могут быть химерными, то есть различные части антитела могут быть образованы из двух различных антител, как дополнительно описано ниже. Антигенсвязывающие молекулы, антитела или связывающие фрагменты могут быть получены в гибридомах, посредством методик рекомбинантной ДНК, или посредством ферментативного или химического отщепления интактных антител. Если не указано иное, термин "антитело" включает, помимо антител, содержащих две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи, его производные, варианты, фрагменты и мутеины, примеры которых описаны ниже. Более того, если явно не исключено, антитела включают моноклональные антитела, биспецифические антитела, миниантитела, доменные антитела, синтетические антитела (иногда называемые в данном документе "миметиками антител"), химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела, слияния антител (иногда называемые в данном документе "конъюгатами антител") и их фрагменты соответственно.

Вариабельные области, как правило, демонстрируют ту же общую структуру областей относительно консервативного каркаса (FR), соединенных посредством 3 гипервариабельных областей (т.е. "CDR"). CDR из двух цепей каждой пары обычно выравниваются посредством областей каркаса, которые могут обеспечивать связывание с конкретным эпитопом. От N-конца до C-конца, вариабельные области как легкой цепи, так и тяжелой цепи обычно содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Условно считается, что области CDR в тяжелой цепи обычно называются HC CDR1, CDR2 и CDR3. Области CDR в легкой цепи обычно называются LC CDR1, CDR2 и CDR3. Назначение аминокислот для каждого домена обычно соответствует определению Kabat (Seqs of Proteins of Immunological Interest (NIH, Bethesda, MD (1987 и 1991)), или Chothia (J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987); Chothia et al., Nature, 342:878-883 (1989)). Для идентификации или приблизительного определения областей CDR могут использоваться различные способы, включая не только Kabat или Chothia, но также определение AbM.

Термин "легкая цепь" включает полноразмерную легкую цепь и ее фрагменты с достаточной последовательностью вариабельной области для обеспечения специфичности связывания. Полноразмерная легкая цепь включает домен вариабельной области,  $V_L$ , и домен постоянной области,  $C_L$ . Домен вариабельной области легкой цепи представляет собой amino-конец полипептида. Легкие цепи включают kappa-цепи и lambda-цепи.

Термин "тяжелая цепь" включает полноразмерную тяжелую цепь и ее фрагменты с достаточной последовательностью вариабельной области для обеспечения специфичности связывания. Полноразмерная тяжелая цепь включает домен вариабельной области,  $V_H$ , и три домена постоянной области,  $CH1$ ,  $CH2$ , и  $CH3$ . Домен  $V_H$  расположен у amino-конца полипептида, а домены  $C_H$  расположены у карбоксильного конца, при этом  $CH3$  наиболее близко расположен к карбоксильному концу полипептида. Тяжелые цепи могут представлять собой любой изотип, в том числе IgG (включая подтипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgA (включая подтипы IgA1 и IgA2), IgM и IgE.

Термин "вариабельная область" или "вариабельный домен" относится к части легкой и/или тяжелой

цепей антитела, обычно включая примерно аминоконец от 120 до 130 аминокислот в тяжелой цепи и приблизительно от 100 до 110 аминоконцевых аминокислот в легкой цепи. Варибельная область антитела обычно определяет специфичность конкретного антитела в отношении его мишени.

Варибельность не распределяется равномерно по всем варибельным доменам антител; она сосредоточена в поддоменах каждой из варибельных областей тяжелой и легкой цепей. Такие поддомены называются "гиперварибельными областями" или "определяющими комплементарность областями" (CDR). Более консервативные (т.е. негиперварибельные) части варибельных доменов называются "каркасными" областями (FRM или FR) и обеспечивают каркас для образования антигенсвязывающей поверхности из шести CDR в трехмерном пространстве. Варибельные домены встречающихся в природе тяжелых и легких цепей содержат четыре FRM-области (FR1, FR2, FR3 и FR4), в основном используя конфигурацию  $\beta$ -листа, соединенную тремя гиперварибельными областями, которые образуют петли, соединяющие структуру  $\beta$ -листа, а в некоторых случаях образующие часть его структуры. Гиперварибельные области в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости от FRM и вместе с гиперварибельными областями другой цепи способствуют образованию антигенсвязывающего сайта (см. Kabat с соавт., loc. cit.).

Термин "CDR" в единственном и множественном числе относится к определяющей комплементарности области. Три такие области придают связывающий характер варибельной области легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3), а еще три придают связывающий характер варибельной области тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3). CDR содержат большую часть остатков, ответственных за специфические взаимодействия антитела с антигеном и, следовательно, способствуют функциональной активности молекулы антитела: они являются основными детерминантами антигенной специфичности.

Конкретные определения границ и длин CDR привязаны к различным системам классификации и нумерации. Поэтому CDR могут определяться по Kabat, Chothia, определениям контактных или любых других границ, включая описанную в данном документе систему нумерации. Несмотря на разные границы, каждая из таких систем имеет некоторую степень перекрытия в том, что составляет так называемые "гиперварибельные области" в варибельных последовательностях. Таким образом, определения CDR в соответствии с этими системами могут различаться по длине и границам областей относительно смежной каркасной области. См., например, Kabat (подход, основанный на межвидовой варибельности последовательностей), Chothia (подход, основанный на кристаллографических исследованиях комплексов антиген-антитело) и/или MacCallum (Kabat с соавт., loc. cit.; Chothia с соавт., *J. Mol. Biol.*, 1987 г., 196: 901-917; и MacCallum с соавт., *J. Mol. Biol.*, 1996 г., 262: 732). Еще одним стандартом для определения характеристик сайта связывания антигена является определение AbM, используемое программным обеспечением для моделирования антител AbM Oxford Molecular. См., например, *Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains*. В: *Antibody Engineering Lab Manual* (Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). В той мере, в которой два метода идентификации остатков определяют области перекрывающихся, но не идентичных областей, их можно объединить для определения гибридного CDR. Однако нумерация в соответствии с так называемой системой Kabat является предпочтительной.

Как правило, CDR образуют петлевую структуру, которая может быть классифицирована как каноническая структура. Термин "каноническая структура" относится к конформации основной цепи, которая определяется петлями связывания антигена (CDR). В результате сравнительных структурных исследований было установлено, что пять из шести антигенсвязывающих петель имеют только ограниченный репертуар доступных конформаций. Каждая каноническая структура может быть охарактеризована углами закручивания полипептидного остова. Таким образом, соответственные петли между антителами могут иметь достаточно схожие трехмерные структуры, несмотря на высокую варибельность аминокислотной последовательности в большинстве частей петель (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 1987 г., 196: 901; Chothia с соавт., *Nature*, 1989 г., 342: 877; Martin and Thornton, *J. Mol. Biol.*, 1996 г., 263: 800). Кроме того, существует взаимосвязь между принятой структурой петель и окружающими ее аминокислотными последовательностями. Конформация конкретного канонического класса определяется длиной петли и аминокислотными остатками, находящимися в ключевых положениях внутри петли, а также в пределах консервативного каркаса (т.е. вне петли). Таким образом, назначение конкретного канонического класса может быть основано на наличии этих ключевых аминокислотных остатков.

Термин "каноническая структура" может также включать в себя соображения относительно линейной последовательности антитела, например, в соответствии с каталогизацией по Kabat (Kabat с соавт., loc. cit.). Схема (система) нумерации Kabat является широко принятым стандартом для нумерации аминокислотных остатков варибельного домена антитела согласованным образом и является предпочтительной схемой, применяемой в настоящем изобретении, как также упоминалось в другой части данного документа. Дополнительные соображения по структуре также могут быть использованы для определения канонической структуры антитела. Например, подобные различия, не полностью отраженные нумерацией Kabat, могут быть описаны системой нумерации Chothia с соавт. и/или раскрыты другими методиками, например посредством кристаллографии и двух- или трехмерного компьютерного моделирования.

Соответственно, данная последовательность антител может быть отнесена к каноническому классу, который позволяет, среди прочего, идентифицировать соответствующие каркасные последовательности (например, исходя из желания включить в библиотеку множество канонических структур). Нумерация аминокислотных последовательностей антител по Kabat и соображения по структуре в соответствии с описанием у Chothia с соавт., loc. cit., а также их значение для интерпретации канонических аспектов структуры антител описаны в соответствующей литературе. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны в данной области. Для ознакомления с обзором структуры антител см. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow с соавт., 1988 г.

CDR3 легкой цепи и, в частности, CDR3 тяжелой цепи могут представлять собой наиболее важные детерминанты связывания антигена в переменных областях легкой и тяжелой цепи. В некоторых конструкциях антител CDR3 тяжелой цепи, по-видимому, представляет собой основную область контакта между антигеном и антителом. Схемы отбора *in vitro*, в которых изменяется только CDR3, могут быть использованы для изменения связывающих свойств антитела или определения того, какие остатки вносят вклад в связывание антигена. Следовательно, CDR3, как правило, является наибольшим источником молекулярного разнообразия в сайте, связывающем антитело. H3, например, может составлять в длину всего два аминокислотных остатка или превышать 26 аминокислот.

Термин "нейтрализующий" относится к антигенсвязывающей молекуле, scFv или антителу, соответственно, которые связываются с лигандом и предупреждают или снижают биологический эффект данного лиганда. Это может быть осуществлено, например, посредством непосредственного блокирования области связывания на лиганде или посредством связывания с лигандом и изменения способности лиганда к связыванию посредством не прямых средств (таких как структурные или энергетические изменения в лиганде). В некоторых вариантах осуществления термин может также обозначать антигенсвязывающую молекулу, которая предупреждает осуществление биологической функции белком, с которым она связывается.

Термин "мишень" или "антиген" относится к молекуле или части молекулы, способным связываться антигенсвязывающей молекулой. В некоторых вариантах осуществления мишень может иметь один или несколько эпитопов.

Термин "конкурировать", при применении в контексте антигенсвязывающих молекул, которые конкурируют за один и тот же эпитоп, означает конкуренцию между антигенсвязывающими молекулами, как определено в анализе, в котором тестируемая антигенсвязывающая молекула (например, антитело или ее иммунологически функциональный фрагмент) предупреждает или ингибирует (например, снижает) специфическое связывание упомянутой антигенсвязывающей молекулы с антигеном. Могут применяться различные типы анализов конкурентного связывания для определения того, конкурирует ли антигенсвязывающая молекула с другой молекулой, например прямой или непрямой радиоиммунологический анализ твердой фазы (RIA), прямой или непрямой ферментный иммунологический анализ твердой фазы (EIA), анализ многослойной конкуренции (Stahli et al., 1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253); прямой биотин-авидиновый EIA твердой фазы (Kirkland et al., 1986, *J. Immunol.* 137:3614-3619), прямой анализ с меткой твердой фазы, прямой многослойный анализ с меткой твердой фазы (Harlow and Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); прямой RIA твердой фазы с меткой с использованием 1-125 меток (Morel et al., 1988, *Molec. Immunol.* 25:7-15); прямой биотин-авидиновый EIA твердой фазы (Cheung, et al., 1990, *Virology* 176:546-552); и прямой RIA с меткой (Moldenhauer et al., 1990, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82). Термин "эпитоп" включает любую детерминанту, способную связываться антигенсвязывающей молекулой, например, scFv, антитело или иммунная клетка по настоящему изобретению. Эпитоп представляет собой область антигена, которая связывается антигенсвязывающей молекулой, нацеленной на данный антиген, и антиген представляет собой белок, то он включает особые аминокислоты, которые непосредственно контактируют с антигенсвязывающей молекулой.

Применяемые в данном документе термины "метка" или "меченный" относятся к введению детектируемого маркера, например, путем введения меченной радиоизотопами аминокислоты или прикрепления к полипептиду биотиновых фрагментов, которые могут быть обнаружены с помощью отмеченного авидина (например, стрептавидина, содержащего флюоресцентный маркер, или ферментативной активности, которая может быть обнаружена посредством оптических или колориметрических способов). В некоторых вариантах осуществления метка или маркер также могут быть терапевтическими. Различные способы нанесения меток на полипептиды и гликопротеины известны в данной области и могут быть использованы.

В соответствии с настоящим изобретением тип "включено-выключено" или другие типы методики контрольного переключения могут быть включены в данный документ. Данные методики могут предусматривать применение доменов димеризации и необязательных активаторов такой димеризации доменов. Данные методики включают, например, методики, описанные Wu et al., *Science* 2014 350 (6258) с использованием систем димеризации FKBP/Rapalog в определенных клетках, при этом содержание статьи включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Дополнительная технология димеризации описана, например, в Fegan et al. *Chem. Rev.* 2010, 110, 3315-3336, а также в патентах

США №№ 5830462; 5834266; 5869337 и 6165787, содержание которых также включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Дополнительные пары димеризации могут включать циклоспорин-А/циклофилин, рецептор, эстроген/эстрогеновый рецептор (необязательно с использованием тамоксифена), глюкокортикоиды/глюкокортикоидный рецептор, тетрациклин/тетрациклиновый рецептор, витамин D/рецептор витамина D. Следующие примеры технологии димеризации можно найти, например, в WO 2014/127261, WO 2015/090229, US 2014/0286987, US 2015/0266973, US 2016/0046700, патенте США № 8486693, US 2014/0171649 и US 2012/0130076, содержание которых также включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

#### Способы лечения

С использованием адоптивной иммунотерапии исходные Т-клетки могут быть (i) удалены у пациента, (ii) созданы методами генетической инженерии для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), который связывается по меньшей мере с одним антигеном опухоли или (iii) расширены *ex vivo* в большую популяцию разработанных Т-клеток, и (iv) повторно введены пациенту. См., например, патенты США №№ 7741465 и 6319494, Eshhar et al. (Cancer Immunol, supra); Krause et al. (supra); Finney et al. (supra). После того, как разработанные Т-клетки повторно вводят пациенту, они опосредуют иммунный ответ в отношении клеток, экспрессирующих антиген опухоли. См., например, Krause et al., J. Exp. Med., Volume 188, No. 4, 1998 (619-626). Данный иммунный ответ включает секрецию IL-2 и других цитокинов Т-клетками, клональную экспансию Т-клеток, распознающих антиген опухоли и опосредованное Т-клетками специфическое уничтожение мишень-положительных клеток. См. Hombach et al., Journal of Immun. 167: 6123-6131 (2001).

Следовательно, в некоторых аспектах настоящее изобретение включает способ лечения или предупреждения состояния, связанного с нежелательными и/или повышенными уровнями FLT3 у пациента, включающий введение пациенту, нуждающегося в этом, эффективного количества по меньшей мере одной выделенной антигенсвязывающей молекулы, CAR или TCR, раскрытых в данном документе.

Представлены способы для лечения заболеваний или нарушений, в том числе рака. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к созданию опосредованного Т-клетками иммунного ответа у субъекта, включающему введение субъекту эффективного количества разработанных иммунных клеток по настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления опосредованный Т-клетками иммунный ответ направлен против клеток-мишеней или клеток. В некоторых вариантах осуществления разработанная иммунная клетка содержит химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR). В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой клетку опухоли. В некоторых аспектах настоящее изобретение содержит способ лечения или предупреждения образования злокачественной опухоли, при этом указанный способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества по меньшей мере одной выделенной антигенсвязывающей молекулы, описанной в данном документе. В некоторых аспектах настоящее изобретение содержит способ лечения или предупреждения образования злокачественной опухоли, при этом указанный способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества по меньшей мере одной иммунной клетки, где иммунная клетка содержит по меньшей мере один химерный антигенный рецептор, Т-клеточный рецептор и/или выделенной антигенсвязывающей молекулы, как описано в данном документе.

В некоторых аспектах настоящее изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую по меньшей мере одну антигенсвязывающую молекулу, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемое вспомогательное средство. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит дополнительное активное средство.

Антигенсвязывающие молекулы, CAR, TCR, иммунные клетки и т.п. по настоящему изобретению могут применяться для лечения миелоидных заболеваний, в том числе без ограничения острый миелоидный лейкоз (AML), хронический миелогенный лейкоз (CML), хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML), ювенильный миеломоноцитарный лейкоз, атипичский хронический миелоидный лейкоз, острый промиелоцитный лейкоз (APL), острый монобластный лейкоз, острый эритроидный лейкоз, острый мегакариобластный лейкоз, миелодиспластический синдром (MDS), миелопролиферативное нарушение, миелоидное новообразование, миелоидную саркому, или их комбинаций. Дополнительные заболевания включают воспалительные и/или аутоиммунные заболевания, например, ревматоидный артрит, псориаз, виды аллергии, астма, болезнь Крона, IBD, IBS, фибромиалгию, мастоцитоз и глютеную энтеропатию..

Следует понимать, что целевые дозы для CAR<sup>+</sup>/CAR-T<sup>+</sup>/TCR<sup>+</sup>-клеток могут варьировать в диапазоне  $1 \times 10^6$ - $2 \times 10^{10}$  клеток/кг, предпочтительно  $2 \times 10^6$  клеток/кг, более предпочтительно. Следует понимать, что дозы выше и ниже данного диапазона могут быть пригодны для определенных субъектов, и пригодные уровни дозы при необходимости могут быть определены лечащим врачом. Кроме того, могут быть представлены несколько доз клеток в соответствии с настоящим изобретением.

Также представлены способы уменьшения размера опухоли у субъекта, включающие введение субъекту разработанной клетки по настоящему изобретению, где клетка включает химерный антигенный рецептор, Т-клеточный рецептор или Т-клеточный рецептор на основе химерного антигенного рецептора, содержащего антигенсвязывающую молекулу, связывающуюся с антигеном опухоли. В некоторых

вариантах осуществления у субъекта наблюдается солидная опухоль или злокачественная опухоль крови, например, лимфома или лейкоз. В некоторых вариантах осуществления разработанная клетка доставляется в ложе опухоли. В некоторых вариантах осуществления рак присутствует в костном мозге субъекта.

В некоторых вариантах осуществления разработанные клетки представляют собой аутологические Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления разработанные клетки представляют собой аллогенные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления разработанные клетки представляют собой гетерологические Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления разработанные клетки по настоящей заявке трансфицированы или преобразованы *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления разработанные клетки по настоящей заявке трансфицированы или преобразованы *ex vivo*.

Способы могут дополнительно включать введение одного или нескольких химиотерапевтических средств. В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой снижающие функцию лимфоцитов (предварительно адаптирующие) химиотерапевтические средства. Преимущественные схемы предварительного лечения, вместе с соответствующими преимущественными биомаркерами, описаны в предварительных заявках на патент 62/262143 и 62/167750, которые включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. В них описаны, например, способы адаптации пациента, нуждающегося в Т-клеточной терапии, включающие введение пациенту определенных преимущественных доз циклофосфида (от 200 мг/м<sup>2</sup>/сут. до 2000 мг/м<sup>2</sup>/сут.) и определенных доз флударабина (от 20 мг/м<sup>2</sup>/сут. до 900 мг/м<sup>2</sup>/сут.). Предпочтительная схема дозирования включает лечение пациента, предусматривающее ежедневное введение пациенту приблизительно 500 мг/м<sup>2</sup>/сут. циклофосфида и приблизительно 60 мг/м<sup>2</sup>/сут. флударабина в течение трех дней перед введением пациенту терапевтически эффективного количества разработанных Т-клеток.

В других вариантах осуществления каждое из антигенсвязывающей молекулы, преобразованных (или иным образом разработанных) клеток (например, CAR или TCR) и химиотерапевтического средства вводят в количестве, эффективном для лечения заболевания или состояния у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления композиции, содержащие CAR-экспрессирующие иммунные эффекторские клетки, раскрытые в данном документе, можно вводить вместе с любым числом химиотерапевтических средств. Примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклофосфамид (CYTOXAN™); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азаридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, в том числе альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилендиофосфаорамид и триметилломеламин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамуцин, ифосфамид, мехлоретамин, мехлоретамин оксид гидрохлорид, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урамустин; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как аклациномицины, активномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, калихимицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицины, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эсорубицин, идарубицин, марцеломицин, митомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицины, потфиروмицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, циностаин, зорубицин; ингибиторы обмена веществ, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидеоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин, 5-FU; андрогены, такие как калустерон, пропионат дромостанолон, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; средства, подавляющие функции надпочечников, такие как аминоклутетимид, митоган, трилостан; компенсатор фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамид гликозид; аминоклевулиновая кислота; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдтраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элформитин; эллиптиния ацетат; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентосатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразин; прокарбазин; PSK®; разоксан; сизофиран; спирогерманий; тенуазоно-вая кислота; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ага-С"); циклофосфамид; тиотепа; таксаны, например, паклитаксел (TAXOL™, Bristol-Myers Squibb) и дексетаксел (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Roger); хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навелбин; новатрон; тенипозид; дауномицин; аминоклутетин; кселода; ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS2000; дифформетилорнитин (DMFO); производные ретиноевой кислоты, такие как Targretin™ (бексаротен), Panretin™, (алитретиноин); ONTAK™ (денилейкин дифтитокс); эсперамицины; капецитабин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из приведенного выше. Также в данное определение включены противогормональные средства, которые действуют для регулирования или ингибирования действия гормонов относи-

тельно опухоли, например, антиэстрогены, в том числе, например, тамоксифен, ралоксифен, ингибирующие ароматазу 4(5)-имидазолы, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен (Фарестон); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и госерелин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из приведенного выше. При необходимости также вводят комбинации химиотерапевтических средств, в том числе без ограничения СНОР, т.е. циклофосфамид (Цитоксан®), доксорубин (гидроксидоксорбицин), винкристин (Онковин®) и преднизон.

В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтическое средство вводят одновременно или в течение недели после введения разработанной клетки или нуклеиновой кислоты. В других вариантах осуществления химиотерапевтическое средство вводят от 1 до 4 недель или от 1 недели до 1 месяца, от 1 недели до 2 месяцев, от 1 недели до 3 месяцев, от 1 недели до 6 месяцев, от 1 недели до 9 месяцев или от 1 недели до 12 месяцев после введения разработанной клетки или нуклеиновой кислоты. В других вариантах осуществления химиотерапевтическое средство вводят по меньшей мере за 1 месяц до введения клетки или нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают введение двух или более химиотерапевтических средств.

Большое количество дополнительных терапевтических средств можно применять вместе с композициями, описанными в данном документе. Например, потенциально пригодные дополнительные терапевтические средства включают ингибиторы PD-1, такие как ниволумаб (Opdivo®), пембролизумаб (Keytruda®), пембролизумаб, пидилизумаб и атезолизумаб.

Дополнительные терапевтические средства, пригодные для применения в комбинации с настоящим изобретением, включают без ограничения ибрутиниб (Imbruvica®), офатумумаб (Arzega®), ритуксимаб (Rituxan®), бевацизумаб (Avastin®), трастузумаб (Herceptin®), трастузумаб эмастатин (KADCYLA®), иматиниб (Gleevec®), цетуксимаб (Erbix®), панитумумаб (Vectibix®), катумаксомаб, ибритумомаб, офатумумаб, тозитумомаб, брентуксимаб, алемтузумаб, гемтузумаб, эрлотиниб, гефитиниб, вандетаниб, афатиниб, лапатиниб, нератиниб, акситиниб, маситиниб, пазопаниб, сунитиниб, сорафениб, тоцераниб, лестауртиниб, акситиниб, цедираниб, ленватиниб, нинтенданиб, пазопаниб, регорафениб, семаксаниб, сорафениб, сунитиниб, тивозаниб, тоцераниб, вандетаниб, энтректиниб, кабозантиниб, иматиниб, дасатиниб, нилотиниб, понатиниб, радотиниб, босутиниб, лестауртиниб, руксолитиниб, пакритиниб, кобиметиниб, селуметиниб, траметиниб, биниметиниб, алектиниб, церитиниб, кризотиниб, афлиберцепт, адипотид, денилейкин дифтитокс, mTOR-ингибиторы, такие как Эверолимус и Темсиролимус, ингибиторы сигнального пути Hedgehog, такие как сонидегиб и висмодегиб, ингибиторы CDK, такие как ингибитор CDK (палбоциклиб).

В дополнительных вариантах осуществления композицию, содержащую включающую CAR иммунную клетку, можно вводить с противовоспалительным средством. Противовоспалительные средства или лекарственные средства включают без ограничения стероиды и глюкокортикоиды (в том числе бетаметазон, будесонид, дексаметазон, гидрокортизона ацетат, гидрокортизон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизолон, преднизон, триамцинолон), нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (NSAIDs), в том числе аспирин, ибупрофен, напроксен, метотрексат, сульфасалазин, лефлуномид, лекарственные средства против TNF, циклофосфамид и микофенолат. Иллюстративные NSAID включают ибупрофен, напроксен, напроксен натрия, ингибиторы Cox-2 и салилаты. Иллюстративные обезболивающие средства включают ацетаминофен, оксикодон, трамадол или пропоксифен гидрохлорид. Иллюстративные глюкокортикоиды включают кортизон, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизолон или преднизон. Иллюстративные модификаторы биологического ответа включают молекулы, направленные против маркеров поверхности клетки (например, CD4, CD5 и т.д.), ингибиторов цитокина, например, антагонистов TNF (например, этанерцепт (ENBREL®), адалимумаб (HUMIRA®) и инфликсимаб (REMICADE®)), ингибиторы хемокина и ингибиторы адгезионной молекулы. Модификаторы биологического ответа включают моноклональные антитела, а рекомбинантные формы молекул. Иллюстративные DMARD включают азатиоприн, циклофосфамид, циклоспорин, метотрексат, пеницилламин, лефлуномид, сульфасалазин, гидроксихлорохин, золото (для перорального (ауранофин) и внутримышечного введения) и миноциклин.

В некоторых вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе, вводят вместе с цитокином. Применяемый в данном документе "цитокин" предназначен для обозначения белков, высвобождаемых одной популяцией клеток, которые действуют на другую клетку в качестве межклеточных медиаторов. Примерами цитокинов являются лимфокины, монокины и обычные полипептидные гормоны. Помимо цитокинов включены гормоны роста, такие как гормон роста человека, N-метионилловый гормон роста человека и бычий гормон роста; паратиреоидный гормон; тироксин; инсулин; проинсулин; релаксин; прорелаксин; гликопротеиновые гормоны, такие как фолликулостимулирующий гормон (FSH), тиреотропный гормон (TSH) и лютеинизирующий гормон (LH); фактор роста печени (HGF); фактор роста фибробластов (FGF); пролактин; плацентарный лактоген; мюллеровская ингибирующая субстанция; пептид, связанный с гонадотропином мышцы; ингибин; активин; фактор роста эндотелия сосудов; интегрин; тромбopoэтин (TPO); факторы роста нервов (NGF), такие как NGF-бета;

фактор роста тромбоцитов; трансформирующие факторы роста (TGF), такие как TGF-альфа и TGF-бета; инсулиноподобный фактор роста-I и -II; эритропоетин (EPO); остеиндуктивные факторы; интерфероны, такие как интерферон-альфа, бета и -гамма; колониестимулирующие факторы (CSF), такие как макрофаг-CSF (M-CSF); гранулоцит-макрофаг-CSF (GM-CSF); и гранулоцит-CSF (G-CSF); интерлейкины (IL), такие как IL-1, IL-1-альфа, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, фактор некроза опухоли, такой как TNF-альфа или TNF-бета; и другие полипептидные факторы, в том числе LIF и комплектный лиганд (KL). Применяемый в данном документе термин цитокин включает белки из натуральных источников или из рекомбинантной клеточной культуры, и биологически активные эквиваленты цитокинов исходной последовательности.

В некоторых аспектах настоящее изобретение включает антигенсвязывающую молекулу, которая связывается с FLT3 при  $K_d$  менее 100 пМ. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула связывается при  $K_d$  менее 10 пМ. В других вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула связывается при  $K_d$  менее 5 пМ.

#### Способы получения

Для получения полинуклеотидов может использоваться множество методик, полипептидов, векторов, антигенсвязывающих молекул, иммунных клеток, композиций и т.п. по настоящему изобретению.

Перед управлением или генетической модификацией *in vitro* иммунных клеток, описанных в данном документе, клетки могут быть получены у субъекта. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки включают Т-клетки. Т-клетки могут быть получены из ряда источников, в том числе мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), костного мозга, ткани лимфатических узлов, пуповинной крови, ткани вилочковой железы, ткани области инфекции, асцитов, плеврального выпота, ткани селезенки и опухолей. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки могут быть получены из единицы крови, собранной у субъекта с использованием ряда методик, известных специалисту в данной области, например, отделением FICOLL™. Клетки могут быть предпочтительно получены из циркулирующей крови индивида посредством афереза. Продукт афереза обычно содержит лимфоциты, в том числе Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие образованные ядром белые клетки крови, эритроциты и тромбоциты. В некоторых вариантах осуществления клетки, собранные посредством афереза, могут быть промыты для удаления фракции плазмы помещены в соответствующий буфер или среду для дальнейшей обработки. Клетки могут быть промыты с помощью PBS. Как будет понятно, можно применять стадию промывки, например, с использованием полуавтоматической проточной центрифуги, например, клеточного процессора Cobe™ 2991, Baxter CytoMate™ или подобных. После промывания клетки могут быть повторно суспендированы в различных биосопоставимых буферах или другом солевом растворе с буфером или без него. В некоторых вариантах осуществления нежелательные компоненты образца для афереза могут быть удалены.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки выделяют из PBMC посредством разрушения эритроцитов и снижения функции моноцитов, например, с использованием центрифугированием через градиент PERCOLL™. Конкретная субпопуляция Т-клеток, например, CD28<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup>, и CD45RO<sup>+</sup>-Т-клетки могут быть дополнительно выделены посредством методик положительной или отрицательной селекции, известных в данной области. Например, обогащение популяции Т-клеток посредством отрицательной селекции может быть достигнуто с комбинацией антител, направленных на поверхностные маркеры, уникальные для отрицательно выбранных клеток. Один способ для применения в настоящем документе представляет собой сортировку и/или селекции клеток посредством отрицательной магнитной иммуноадагезии или проточной цитометрии, в которых применяют смесь моноклональных антител, направленных на маркеры поверхности клетки, присутствующие на отрицательно выбранных клетках. Например, для обогащения клеток CD4<sup>+</sup> посредством отрицательной селекции, смесь моноклональных антител обычно включает антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. Проточную цитометрию и сортировку клеток также можно применять для выделения популяции клеток, представляющих интерес, для применения по настоящему изобретению.

PBMC могут использоваться непосредственно для генетической модификации с иммунными клетками (например, CAR или TCR) с использованием способов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления после выделения PBMC Т-лимфоциты могут быть дополнительно выделены, и как цитотоксичные, так и хелперные Т-лимфоциты могут быть рассортированы на первичные, запоминающих и эффекторные субпопуляции Т-клеток, либо до, либо после генетической модификации и/или экспансии.

В некоторых вариантах осуществления клетки CD8<sup>+</sup> дополнительно рассортированы на первичные, центральные запоминающие и эффекторные клетки посредством идентификации антигенов клеточной поверхности, которые связаны с каждым из данных типов клеток CD8<sup>+</sup>. В некоторых вариантах осуществления экспрессия фенотипических маркеров центральных запоминающих Т-клеток включает CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3, и CD127 и отрицательная для гранзима В. В некоторых вариантах осуществления центральные запоминающие Т-клетки представляют собой CD45RO<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>-Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления эффекторные Т-клетки отрицательны для CD62L, CCR7, CD28 и

CD127, и положительны для гранзима В и перфорина. В некоторых вариантах осуществления CD4<sup>+</sup>-Т-клетки дополнительно рассортированы на субпопуляции. Например, хелперные CD4<sup>+</sup>-Т-клетки могут быть рассортированы на первичные, центральные запоминающие и эффекторные клетки посредством идентификации популяций клеток, которые имеют антигены клеточной поверхности.

Иммунные клетки, такие как Т-клетки, могут быть генетически модифицированы после выделения с использованием известных способов, или иммунные клетки могут быть активированы и расширены (или дифференцированы в случае предшественников) *in vitro* перед генетической модификацией. В другом варианте осуществления иммунные клетки, такие как Т-клетки, генетически модифицированы химерными антигенными рецепторами, описанными в данном документе (например, преобразованными вирусным вектором, содержащим одну или несколько нуклеотидных последовательностей, кодирующих CAR), а затем активированы и/или расширены *in vitro*. Способы активации и расширения Т-клеток известны в данной области и описаны, например, патенте США № 6905874; патенте США № 6867041; патенте США № 6797514; и РСТ WO 2012/079000, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Как правило, такие способы включают приведение в контакт РВМС или выделенных Т-клеток со симулирующим средством и костимулирующим средством, например, антителами к CD3 и CD28, как правило, прикрепленным к грануле или другой поверхности, в культуральной среде с соответствующими цитокинами, таким как IL-2. Антитела к CD3 и CD28, прикрепленные к одной и той же грануле, выступают в качестве представляющей "суррогатный" антиген клетки (APC). Одним примером является система The Dynabeads®, система стимулятора/активатора CD3/CD28 для физиологической активации человеческих Т-клеток.

В других вариантах осуществления Т-клетки могут быть активированы и стимулированы для пролиферации с питающими клетками и соответствующими антителами и цитокинами с использованием таких способов, как описанные в патенте США № 6040177; патенте США № 5827642; и WO 2012129514, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Некоторые способы получения конструкций и разработанных иммунных клеток по настоящему изобретению описаны в заявке РСТ РСТ/US15/14520, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Дополнительные способы получения конструкций и клеток могут быть найдены в Предварительной заявке на патент США № 62/244036, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Следует понимать, что РВМС могут дополнительно включать другие цитотоксичные лимфоциты, такие как НК-клетки или НКТ-клетки. Вектор экспрессии, несущий кодирующую последовательность химерного рецептора, раскрытого в данном документе, может быть введен в популяцию Т-клеток, НК-клеток или НКТ-клеток донора-человека. Успешно преобразованные Т-клетки, которые несут вектор экспрессии, могут быть отсортированы с использованием проточной цитометрии для выделения CD3-положительных Т-клеток, а затем дополнительно размножены для повышения числа данных экспрессирующих CAR Т-клеток, помимо активации клеток с использованием антител к CD3 и IL-2 или других способов, известных в данной области, как описано в любом другом месте данного документа. Для криоконсервирования Т-клеток, экспрессирующих CAR, для хранения и/или получения с целью применения в отношении субъекта-человека могут применяться стандартные процедуры. В одном варианте осуществления преобразование *in vitro*, культивирование и/или экспансию Т-клеток осуществляют в отсутствие не являющихся человеческими образованные из животных источников продуктов, таких как эмбриональная телячья сыворотка и фетальная бычья сыворотка.

Для клонирования полинуклеотидов вектор можно вводить в клетку-хозяина (выделенную клетку-хозяина) для обеспечения репликации вектора самого по себе и, таким образом, амплификации копий полинуклеотида, содержащегося в нем. Клонирование векторов могут содержать компоненты последовательности, которые обычно включают без ограничения источник репликации, промоторные последовательности, промоторы инициации транскрипции, энхансерные последовательности и селективируемые маркеры. Данные элементы могут быть выбраны соответствующим образом специалистом в данной области. Например, источник репликации может быть выбран для содействия автономной репликации вектора в клетке-хозяине.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем раскрытии представлены выделенные клетки-хозяева, содержащие вектор, представленный в данном документе. Клетки-хозяева, содержащие вектор, могут быть пригодны в экспрессии или клонировании полинуклеотида, содержащегося в векторе. Пригодные клетки-хозяева могут включать без ограничения прокариотические клетки, грибковые клетки, дрожжевые клетки или высшие эукариотические клетки, например, клетки млекопитающего. Пригодные прокариотические клетки для данной цели включают без ограничения зубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные бактерии организмы, например, Enterobacterales, такие как Escherichia, например, E.coli, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, например, Salmonella typhimurium, Serratia, например, Serratia marcescans, и Shigella, а также Bacilli, такие как B. subtilis и B. licheniformis, Pseudomonas, такие как P. aeruginosa, и Streptomyces.

Вектор можно вводить в клетку-хозяина с использованием любых пригодных способов, известных в данной области, в том числе без ограничения DEAE-декстран-опосредованная доставка, способ осаждения

дения фосфата кальция, опосредованная катионными липидами доставка, опосредованная липосомами трансфекция, электропорация, бомбардировка микрочастицами, рецептор-опосредованная генная доставка, доставка, опосредованная полилизинном, гистоном, хитозаном и пептидами. Стандартные способы трансфекции и трансформации клеток для экспрессии вектора, представляющего интерес, хорошо известны в данной области. В следующем варианте осуществления смесь различных векторов экспрессии для генетической модификации донорной популяции иммунных эффекторных клеток, где каждый вектор кодирует различный CAR, раскрытый в данном документе. Полученные в результате преобразованные иммунные эффекторные клетки образуют смешанную популяцию разработанных клеток, с долей разработанных клеток, экспрессирующих более одного различного CAR.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении представлен способ хранения созданных методами генной инженерии клеток, экспрессирующих CAR или TCR, которые нацелены на белок FLT3. Он предусматривает криоконсервацию иммунных клеток, так что клетки остаются жизнеспособными после оттаивания. Доля иммунных клеток, экспрессирующих CAR, может быть криоконсервирована посредством способов, известных в данной области, для обеспечения постоянного источника таких клеток для будущего лечения пациентов, страдающих злокачественным новообразованием. При необходимости криоконсервированные трансформированные иммунные клетки могут быть оттаяны, выращены и расширены для большего количества таких клеток.

Применяемый в данном документе термин "криоконсервировать" относится к консервации клеток посредством охлаждения до температур ниже нуля, например, (как правило) 77 К или  $-196^{\circ}\text{C}$  (температура кипения жидкого азота). При температурах ниже нуля зачастую применяют криозащитные средства для предупреждения повреждения консервируемых клеток вследствие заморозки при низких температурах или нагревания до комнатной температуры. Криоконсервирующие средства и оптимальные скорости охлаждения могут защитить клетки от повреждения. Криозащитные средства, которые можно применять в соответствии с настоящим изобретением, включают без ограничения диметил сульфоксид (DMSO) (Lovelock & Bishop, *Nature* (1959); 183: 1394-1395; Ashwood-Smith, *Nature* (1961); 190: 1204-1205), глицерин, поливинилпирролидин (Rinfret, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (1960); 85: 576) и полиэтиленгликоль (Sloviter & Ravdin, *Nature* (1962); 196: 48). Предпочтительная скорость охлаждения составляет  $1-3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ .

Термин "по сути чистый" применяют для указания, что приведенный компонент присутствует при высоком уровне. Компонент преимущественно представляет собой главный компонент, присутствующий в композиции. Предпочтительно он присутствует на уровне более 30%, более 50%, более 75%, более 90% или даже более 95%, при этом указанный уровень определен в пересчете на сухой вес/сухой вес относительно общего веса рассматриваемой композиции. При очень высоких уровнях (например, при уровнях более 90%, более 95% или более 99%) компонент может быть рассматриваться как находящийся в "чистой форме". Биологически активные вещества по настоящему изобретению (в том числе полипептиды, молекулы нуклеиновых кислот, антигенсвязывающие молекулы, фрагменты) могут быть представлены в форме, которая по сути не содержит один или несколько загрязнителей, с которыми вещество может быть связано в других случаях. Если композиция по сути не содержит данный загрязнитель, то загрязнитель будет на низком уровне (например, на уровне менее 10%, менее 5% или менее 1% в пересчете на сухой вес/сухой вес, как указано выше).

В некоторых вариантах осуществления клетки составлены путем первого их сбора из их культуральной среды, а затем промывания и концентрации клеток в среде и системе хранения, пригодной для введения ("фармацевтически приемлемый" носитель) в эффективном для лечения количестве. Пригодная среда для инфузий может представлять собой любой изотонический раствор среды, как правило, физиологический раствор, Normosol™ R (Abbott) или Plasma-Lyte™ A (Baxter), но также могут использоваться 5% декстрозы в воде или лактат Рингера. Среда для инфузий может быть дополнена человеческим сывороточным альбумином.

Необходимые для лечения количества клеток в композиции обычно составляют по меньшей мере 2 клетки (например, по меньшей мере 1  $\text{CD8}^+$  центральная запоминающая Т-клетка и по меньшей мере 1  $\text{CD4}^+$  Т-клетка хелперной субпопуляции) или более типично составляют более  $10^2$  клеток, и не более  $10^6$ , не более  $10^8$  или  $10^9$  клеток включительно и могут составлять более  $10^{10}$  клеток. Количество клеток будет зависеть от необходимого применения, для которого предназначена композиция, и типа клеток, включенных в данный документ. Плотность необходимых клеток обычно превышает  $10^6$  клеток/мл и, как правило, превышает  $10^7$  клеток/мл, как правило,  $10^8$  клеток/мл или более. Клинически подходящее количество иммунных клеток может быть разделено на несколько инфузий, которые суммарно равны или превышают  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$  или  $10^{12}$  клеток. В некоторый аспектах настоящего изобретения, в частности поскольку все введенные клетки будут перенаправлены к конкретному антигену-мишени (FLT3), могут быть введены более низкие количества клеток, в диапазоне  $10^6/\text{кг}$  ( $10^6-10^{11}$  на пациента). Терапевтические средства CAR могут быть введены несколько раз при дозировках в пределах данных диапазонов. Клетки могут быть аутологичными, аллогенными или гетерологичными для пациента, подвергающегося лечению.

Экспрессирующие CAR популяции клеток по настоящему изобретению можно вводить либо отдельно, либо в виде фармацевтической композиции в комбинации с разбавителями и/или с другими ком-

понентами, например IL-2 или другими цитокинами, или популяциями клеток. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению может содержать экспрессирующую CAR или TCR популяцию клеток, например, T-клеток, как описано в данном документе, в комбинации с одним или несколькими фармацевтически или приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными средствами. Такие композиции могут содержать буферы, например, нейтральный буферный раствор, фосфатно-буферный раствор и т.п.; углеводороды, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатные средства, такие как EDTA или глутатион; вспомогательные средства (например, гидроксид алюминия); и консерванты. Композиции по настоящему изобретению предпочтительно составлены для внутривенного введения.

Фармацевтические композиции (растворы, суспензии или т.п.) могут включать одно или несколько из следующего: стерильные разбавители, такие как вода для инъекций, солевой раствор, предпочтительно, физиологический раствор, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия, нелетучие масла, такие как синтетические моно-или диглицериды, которые могут выступать в качестве растворителя или суспендирующие среды, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатные средства, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и средства для регулировки тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Препарат для парентерального применения может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или сосуды для нескольких доз из стекла или пластмассы. Инъекционная фармацевтическая композиция предпочтительно является стерильной.

Следует понимать, что нежелательные явления могут быть сведены к минимум посредством преобразования иммунных клеток (содержащих один или несколько CAR или TCR) с "суицидальным" геном. Также может быть необходимо вводить в иммунные клетки индуцируемый переключатель "включения" или "акселератор". Пригодные методики включают применение индуцируемой каспазы-9 (заявка на патент США 2011/0286980) или тимидинкиназы, до, после или одновременно с преобразованием клеток с помощью конструкции CAR по настоящему изобретению. Дополнительные способы введения "суицидальных" генов и/или переключателей "включения" включают TALENS, применение доменов "цинковые пальцы", RNAi, siRNA, shRNA, антисмысловую технологию и другие методики, известные в данной области.

Следует понимать, что описания в данном документе являются исключительно иллюстративными и пояснительными и не ограничивают настоящее изобретение, как заявлено в формуле изобретения. В данной заявке применение форм единственного числа включает множественное число, если явно не указано иное.

Названия разделов, применяемые в данном документе, предназначены исключительно для целей организации и не предназначены для ограничения описанного объекта изобретения. Все документы или части документов, приведенные в данной заявке, в том числе без ограничения патенты, заявки на патент, статьи, книги и научные труды включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для любой цели. Используемые в соответствии с настоящим раскрытием следующие термины, если не указано иное, следует понимать как имеющие следующее значение:

В данной заявке применение "или" означает "и/или", если не указано иное.

Кроме того, применение термина "в том числе", а также других форм, например, "включает" и "включительно", является неограничивающим. Кроме того, такие термины, как "элемент" или "компонент" охватывают как элементы, так и компоненты, содержащие одну единицу и элементы и компоненты, которые содержат более одной субъединицы, если конкретно не указано иное.

Термин "активность FLT3" включает любой биологический эффект FLT3. В некоторых вариантах осуществления активность FLT3 включает способность FLT3 взаимодействовать или связываться с субстратом или рецептором.

Термин "полинуклеотид", "нуклеотид" или "нуклеиновая кислота" включает как одноцепочечные, и двухцепочечные нуклеотидные полимеры. Нуклеотиды, составляющие полинуклеотид, могут представлять собой рибонуклеотиды или дезоксирибонуклеотиды, или модифицированную форму любого типа нуклеотидов. Указанные модификации включают базовые модификации, такие как производные бромуридина и инозина, модификации рибозы, такие как 2',3'-дидеоксирибоза, и модификации межнуклеотидных связей, такие как фосфотиоат, фосфодитиоат, фосфоселеноат, фосфодиселеноат, фосфоанилиотиоат, фосфоанилат и фосфоамидат.

Термин "олигонуклеотид" относится к полинуклеотиду, включающему 200 или меньшее количество нуклеотидов. Олигонуклеотиды могут быть одноцепочечными или двухцепочечными, например, для применения в конструкции мутантного гена. Олигонуклеотиды могут представлять собой смысловые или антисмысловые олигонуклеотиды. Олигонуклеотид может включать метку, в том числе радиоизотопную метку, флуоресцентную метку, гаптенную или антигенную метку, для анализа обнаружения. Олигонуклеотиды могут применяться, например, в качестве праймеров ПЦР, клонирующих праймеров или гибридизационных зондов.

Термин "контрольная последовательность" относится к полинуклеотидной последовательности, ко-

торая воздействует на экспрессию и обработку кодирующей последовательности, с которой она связывается посредством лиганда. Природа такой контрольной последовательности может зависеть от организма-хозяина. В конкретных вариантах осуществления контрольные последовательности для прокариот могут включать промотор, рибосомную область связывания и последовательность терминации транскрипции. Например, контрольные последовательности для эукариот могут включать промоторы, включающие одну или множество областей распознавания для факторов транскрипции, энхансерных последовательностей транскрипции и последовательности терминации транскрипции. "Контрольные последовательности" могут включать лидерные последовательности (сигнальные пептиды) и/или последовательности сливающихся клеток.

Применяемый в данном документе термин "функционально связанный" означает, что компоненты, к которым применяется данный термин, находятся в связи, которая позволяет им осуществлять присутствующие им функции в пригодных условиях.

Термин "вектор" означает любую молекулу или частицу (например, нуклеиновую кислоту, плазмиду, бактериофаг или вирус), применяемую для переноса кодирующей белок информации в клетку-хозяина. Термин "вектор экспрессии" или "конструкция экспрессии" относится к вектору, который пригоден для трансформации клетки-хозяина и содержит последовательности нуклеиновых кислот, которые направляют и/или управляют (вместе с клеткой-хозяином) экспрессией одного или нескольких гетерологичных кодирующих областей, функционально связанных с ними. Конструкции экспрессии могут включать без ограничения последовательности, которые воздействуют или управляют транскрипцией, трансляцией и, если присутствуют интроны, воздействием на сплайсинг РНК кодирующей области, функционально связанной с ними.

Термин "клетка-хозяин" относится к клетке, которая была трансформирована или способна к трансформации, с помощью последовательности нуклеиновой кислоты и таким образом экспрессирует ген, представляющий интерес. Термин включает потомство исходной клетки, независимо от того, является ли потомство идентичным с точки зрения морфологии или генетической конструкции оригинальной исходной клетке или нет, поскольку присутствует ген, представляющий интерес.

Термин "трансформация" относится к изменению генетических характеристик клетки, и клетка была трансформирована, если она была модифицирована с возможностью содержания новых ДНК или РНК. Например, клетка трансформирована, если она генетически модифицирована от ее исходного состояния путем введения нового генетического материала посредством трансфекции, преобразования или других методик. После трансфекции или преобразования трансформирующая ДНК может рекомбинироваться с ДНК клетки путем физической интеграции в хромосому клетки, или может поддерживаться временно в качестве эписомального элемента без репликации, или может подвергаться репликации независимо в виде плазмиды. Клетка считается "стабильно трансформированной", если трансформирующая ДНК подвергается репликации с разделением клетки.

Термин "трансфекция" относится к поглощению клеткой чужеродной или экзогенной ДНК. Ряд методик трансфекции хорошо известен в данной области и раскрыт в данном документе. См., например, Graham et al., 1973, *Virology* 52:456; Sambrook et al., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, supra; Davis et al., 1986, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier; Chu et al., 1981, *Gene* 13:197.

Термин "преобразование" относится к процессу, в котором чужеродная ДНК вводится в клетку посредством вирусного вектора. См. Jones et al., (1998). *Genetics: principles and analysis*. Boston: Jones & Bartlett Publ.

Термины "полипептид" или "белок" относятся к макромолекуле с аминокислотной последовательностью белка, в том числе делеции, добавления и/или замещения одной или нескольких аминокислот исходной последовательности. Термины "полипептид" и "белок" конкретно охватывают антигенсвязывающие молекулы к FLT3, антитела или последовательности, имеющие делеции, добавления и/или замещения одной или нескольких аминокислот антигенсвязывающего белка. Термин "фрагмент полипептида" относится к полипептиду, который имеет аминоконцевую делецию, карбоксильную концевую делецию и/или внутреннюю делецию по сравнению с полноразмерным исходным белком. Такие фрагменты также могут содержать модифицированные аминокислоты по сравнению с исходным белком. Пригодные фрагменты полипептидов включают иммунологически функциональные фрагменты антигенсвязывающих молекул. Пригодные фрагменты включают без ограничения одну или несколько областей CDR, вариабельные домены тяжелой и/или легкой цепи, часть других частей цепи антитела и т.п.

Термин "выделенный" означает (i) не содержащий, по меньшей мере, несколько других белков, с которыми он может встречаться в обычных условиях, (ii) по сути не содержащий других белков из того же источника, например, от других видов, (iii) отделенный по меньшей мере от приблизительно 50% полинуклеотидов, липидов, углеводов или других материалов, с которыми он связан в естественных условиях, (iv) функционально связанный (посредством ковалентного или нековалентного взаимодействия) с полипептидом, с которым он не связан в естественных условиях, или (v) не встречается в естественных условиях.

"Вариант" полипептида (например, антигенсвязывающая молекула или антитело) содержит аминокислотную последовательность, в которой один или несколько аминокислотных остатков введены

внутри, удалены из и/или замещены в аминокислотной последовательности относительно другой полипептидной последовательности. Варианты включают слитые белки.

Термин "идентичность" относится к отношению между последовательностями двух или более молекул полипептидов или двух или более молекул нуклеиновой кислоты, определенному путем выравнивания и сравнения последовательностей. "Процент идентичности" означает процент идентичных остатков между аминокислотами или нуклеотидами в сравниваемых молекулах и рассчитывается на основании размера наименьшей из сравниваемых молекул. Для данных расчетов промежутки в выравниваниях (при наличии) предпочтительно регулируются посредством конкретной математической модели или компьютерной программы (т.е. "алгоритма").

Для расчета процента идентичности сравниваемые последовательности обычно выравнивают с помощью способа, который обеспечивает наибольшее совпадение между последовательностями. Одним примером компьютерной программы, которую можно применять для определения процента идентичности, является программный пакет GCG, который включает GAP (Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.). Компьютерный алгоритм GAP применяется для выравнивания двух полипептидов или полинуклеотидов, для которых необходимо определить процент идентичности последовательности. Последовательности выравниваются для оптимального совпадения их соответствующей аминокислоты или нуклеотида ("совпавшая совокупность", определенная алгоритмом). В некоторых вариантах осуществления стандартная матрица сравнения (см., Dayhoff et al., 1978, Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352 for the PAM 250 comparison matrix; Henikoff et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:10915-10919 для матрицы сравнения BLOSUM 62) также применяется в алгоритме.

Как используется в данном документе, 20 обычных (например, встречающихся в естественных условиях) аминокислот и их сокращений следуют обычному применению. См. Immunology - A Synthesis (2nd Edition, Golub and Gren, Eds., Sinauer Assoc, Sunderland, Mass. (1991)), включенную в данный документ посредством ссылки для любых целей. Стереоизомеры (например, D-аминокислоты) 20 обычных аминокислот, аминокислоты не природного происхождения, такие как альфа-, альфа-дизамещенные аминокислоты, N-алкильные аминокислоты, молочная кислота и другие нетипичные аминокислоты также могут быть пригодными компонентами для полипептидов по настоящему изобретению. Примеры нетипичных аминокислот включают следующие: 4-гидроксипролин, гамма-карбоксиглутамат, эпсилон-N,N,N-триметиллизин, е-N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин, сигма-N-метиларгинин и другие подобные аминокислоты и иминокислоты (например, 4-гидроксипролин). В обозначении полипептида, применяемом в данном документе, левостороннее направление представляет собой аминоконцевое направление, а правостороннее направление представляет собой карбоксильное концевое направление, в соответствии со стандартным применением и условиями.

Консервативные аминокислотные замещения могут охватывать не встречающиеся в естественных условиях аминокислотные остатки, которые обычно вводят путем химического пептидного синтеза, нежели посредством синтеза в биологических системах. Они включают пептидомиметики и другие обращенные или инвертированные формы фрагментов аминокислот. Естественным образом встречающиеся в природе остатки возможно разделить на классы, основанные на общих свойствах боковой цепи:

- a) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- b) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- c) кислотные: Asp, Glu;
- d) основные: His, Lys, Arg;
- e) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro и
- f) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Например, неконсервативные замещения могут предусматривать замену члена одного из данных классов на члена другого класса. Такие замещенные остатки могут быть введены, например, в области человеческого антитела, гомологичные с антителами, не являющимися человеческими, или в негомологичные области молекулы.

В осуществлении изменений антигенсвязывающей молекулы костимулирующей или активирующей домены разработанной Т-клетки, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, может рассматриваться индекс гидрофобности. Каждой аминокислоте был присвоен индекс гидрофобности на основании ее гидрофобности и характеристик изменения. Они представляют собой следующие: изолейцин (+4,5); валин (+4,2); лейцин (+3,8); фенилаланин (+2,8); цистеин/цистин (+2,5); метионин (+1,9); аланин (+1,8); глицин (-0,4); треонин (-0,7); серин (-0,8); триптофан (-0,9); тирозин (-1,3); пролин (-1,6); гистидин (-3,2); глутамат (-3,5); глутамин (-3,5); аспаргат (-3,5); аспарагин (-3,5); лизин (-3,9) и аргинин (-4,5). См. Kyte et al., J. Mol. Biol., 157:105-131 (1982). Известно, что некоторые аминокислоты могут быть замещены другими аминокислотами с подобным индексом гидрофобности или баллом и все еще сохраняют подобную биологическую активность. Также в данной области следует понимать, что замещение подобных аминокислот может эффективно осуществляться на основании гидрофильности, в частности, если биологически функциональный белок или пептид, созданный таким образом, предназначен

для применения в иммунологических вариантах осуществления, как в данном случае. Иллюстративные замещения аминокислот представлены в табл. 2.

Таблица 2

<u>Исходные остатки</u>	<u>Иллюстративные замещения</u>	<u>Предпочтительные замещения</u>
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, норлейцин	Leu
Leu	Норлейцин, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4-диаминомасляный Acid, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, норлейцин	Leu

Термин "производное" относится к молекуле, которая включает химическую модификацию, отличную от вставки, делеции или замещения аминокислот (или нуклеиновых кислот). В некоторых вариантах осуществления производные содержат ковалентные модификации, в том числе без ограничения химическое связывание с полимерами, липидами или другими органическими или неорганическими фрагментами. В некоторых вариантах осуществления химически модифицированная антигенсвязывающая молекула может иметь больший период полувыведения из кровотока, чем антигенсвязывающая молекула, которая химически не модифицирована. В некоторых вариантах осуществления производная антигенсвязывающая молекула ковалентно модифицирована для включения в себя одного или нескольких растворимых в воде полимерных прикреплений, в том числе без ограничения полиэтиленгликоль, полиоксиэтиленгликоль или полипропиленгликоль.

Пептидные аналоги широко применяются в фармацевтической промышленности в качестве непептидных лекарственных средств со свойствами, аналогичными лекарственным средствам с пептидом матрицы. Данные типы непептидного соединения называются "пептидные миметики" или "пептидомиметики". Fauchere, J., Adv. Drug Res., 15:29 (1986); Veber & Freidinger, TINS, p. 392 (1985) и Evans et al., J. Med. Chem., 30:1229 (1987), которая включена в настоящий документ посредством ссылки для любых целей.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству антигенсвязывающей молекулы к FLT3, которое, как определено, обеспечивает терапевтический ответ у млекопитающего. Такие терапевтически эффективные количества легко устанавливаются специалистом в данной области.

Термины "пациент" и "субъект" применяются взаимозаменяемо и включают субъектов-людей и не являющихся людьми животных-субъектов, а также субъектов с ранее диагностированными нарушениями, без ранее диагностированных нарушений, получающих медицинскую помощь, с риском развития нарушений и т.д.

Термин "лечить" и "лечение" включает терапевтические способы лечения, профилактические способы лечения и варианты применения, в которых снижается риск развития у субъекта нарушения или другой фактор риска. Лечение не требует полного излечения нарушения и охватывает варианты осуществления, в которых снижаются симптомы или основные факторы риска. Термин "предупреждать" не требует 100% ликвидации возможности явления. Скорее он обозначает, что вероятность возникновения явления была снижена в присутствии соединения или способа.

Стандартные методики могут применяться для рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов и тканевой культуры и трансформации (например, электропорация, липофекция). Методики ферментативных реакций и очищения могут осуществляться в соответствии с указаниями производителя или как обычно используется в данной области, или как описано в данном документе. Приведенные выше методики и процедуры могут обычно осуществляться в соответствии с обычными способами, хорошо известными в данной области, и как описано в различных общих и более конкретных справочных материалах, которые указаны и обсуждены в данном описании. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), которая включена в данный документ посредством ссылки для любых целей.

Следующие последовательности будут дополнительно иллюстрировать настоящее изобретение.

CD28Т ДНК внеклеточная, трансмембранная, внутриклеточная

СТТGATAATGAAAAGTC  
 AAACGGAACAATCATTACGTGAAGGGCAAGCACCTCTGTCCGTCACCCTTGTCC  
 TGGTCCATCCAAGCCATTCTGGGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGAGTCCTCGCTTGTTA  
 CTCTCTGCTCGTCACCGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTTAGATCCAAAAGAAGCCG  
 CCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCCTGGCCCCACAAGGAA  
 ACASTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTCTGCTGCCTATCGGAGC (SEQ ID  
 NO: 1)

CD28Т внеклеточная, трансмембранная, внутриклеточная AA:

LDNEKSNGTI IHVKGKHLCP SPLFPGPSKP FWVLVVVGGV LACYSLLVTV  
 AFIFWVRSK RSRLHSDYM NMTPRRPGPT RKHYQPYAPP R DFAAYRS (SEQ ID NO: 2)

CD28Т ДНК - внеклеточная

СТТGATAATGAAAAGTCAAACGGAACAATCATTACGTGAAGGGCAA  
 GCACCTCTGTCCGTCACCCTTGTCCCTGGTCCATCCAAGCCA (SEQ ID NO: 3)

CD28Т AA - внеклеточная

LDNEKSNGTI IHVKGKHLCP SPLFPGPSKP (SEQ ID NO: 4)

CD28 ДНК трансмембранный домен

TTCTGGGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGAGTCCTCGCTTGTTACTCTCTGCTCGTCACCG  
 TGGCTTTTATAATCTTCTGGGTT (SEQ ID NO: 5)

CD28 AA трансмембранный домен:FWVLVVVGGV LACYLLVTV AFIFWV (SEQ ID NO: 6)CD28 DNA внутриклеточный домен:AGATCCAAAAGAAGCCGCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCG  
CCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTCG  
STATCGGAGC (SEQ ID NO: 7)CD28 AA внутриклеточный доменRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 8)CD3 дзета ДНКAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCA  
ACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGC  
GCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAACCCCCAGGA  
GGGTCTCTAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAG  
GCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACT  
CAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAG  
G (SEQ ID NO: 9)CD3 дзета AARVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG  
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGLYQGLSTATKDYDALHMQALPPR  
(SEQ ID NO: 10)CD28 ДНКATTGAGGTGATGTATCCACCGCCTTACCTGGATAACGAAAAGAGTAACGGTACCAT  
CATTCACGTGAAAGGTAACACCTGTGTCCTTCTCCCTCTTCCCGGGCCATCAAA  
GCC (SEQ ID NO: 11)CD28 AAIEVMYPPPYL DNEKSNGTII HVKGKHLCPSP LFPGPSKP (SEQ ID NO: 12)CD8 ДНК внеклеточный и трансмембранный доменGCTGCAGCATTGAGCAACTCAATAATGTATTTAGTCACTTTGTACCAGTGTCTTGC  
CGGCTAAGCCTACTACCACCCGCTCCACGGCCACCTACCCAGCTCCTACCATCG  
CTTACAGCCTCTGTCCCTGCGCCAGAGGCTTGCCGACCGCCGAGGGGGCGCTG  
TTCATACCAGAGGACTGGATTTGCGCTGCGATATCTATATCTGGGCACCCCTGGCCG

GAACCTGCGGCGTACTCCTGCTGCCCTGGTCATCACGCTCTATTGTAATCACAGGA  
AC (SEQ ID NO: 13)

CD8 AA внеклеточный и трансмембранный домен

AAALNSIMYFSHFVFPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR  
GLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN (SEQ ID NO: 14)

Клон 10E3 HC ДНК

CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCCTGTGCTGGTGAACCCACAGAGACCCTCAC  
GCTGACCTGCACCGTCTCTGGGTCTCACTCATCAATGCTAGAATGGGTGTGAGCTG  
GATCCGTCAGCCCCAGGGAAGGCCTGGAGTGGCTTGACACATTTTTTCCAATGC  
CGAAAAATCGTACAGGACATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATCTCCAAGGACACCT  
CCAAAAGCCAGGTGGTCCCTTACCATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCACA  
TATTACTGTGCACGGATACCAGGCTACGGTGGTAACGGGGACTACCACTACTACGGT  
ATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 15)

Клон 10E3 HC AA – CDR подчеркнуты

QVTLKESGPVLVKPTELTLTCTVSGFSLINARMGVSWIRPPGKALEWLAHIFSNAEKS  
YRTSLKSRLTISKDTSKSQVVTMTNMDPVDTATYYCARIPGYGGNGDYHYGMDVW  
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 16)

Клон 10E3 HC AA CDR1: NARMGV (SEQ ID NO: 17)

Клон 10E3 HC AA CDR2: HIFSNAEKSYRTSLK (SEQ ID NO: 18)

Клон 10E3 HC AA CDR3: IPGYGGNGDYHYGMDV (SEQ ID NO: 19)

Клон 10E3 LC ДНК

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTCTAGGAGACAGAGTC  
ACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCA  
GAAACCAGGAAAGCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTTCATCCACTTTGCAAAGTGG  
GGTCCCATCAAGGTTACAGCGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACCTCTACAATCA  
GCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGAACCTTATTACTGTCTACAGCATAATAATTTCC  
CGTGGACGTTCCGGTCAGGGAACGAAGGTGGAATCAAACGA (SEQ ID NO: 20)

Клон 10E3 LC AA (CDR подчеркнуты)

DIQMTQSPSSLSASLGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPKAPKRLIYASSTLQSGVPS  
RFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLOHNNFPWFFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 21)

Клон 10E3 LC CDR1 AA: RASQIRNDLG (SEQ ID NO: 22)

Клон 10E3 LC CDR2 AA: ASSTLQS (SEQ ID NO: 23)

Клон 10E3 LC CDR3 AA: LQHNNFPWT (SEQ ID NO: 24)

Клон 2E7 HC ДНК

CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGTAAACCCACAGAGACCCCTCAC  
GCTGACCTGCACCGTCTCTGGGTTCTCACTCAGGAATGCTAGAATGGGTGTAAGCTG  
GATCCGTCAGCTCCCGGAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCACACATTTTTTCGAATGA  
CGAAAAAACCTACAGCACATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATCTCCAGGGACACCT  
CCAAAGGCCAGTGGTCTTACCATGACCAAGATGGACCCTGTGGACACAGCCACA  
TATTA CTGTGCACGGATACCCTACTATGGTTCGGGGAGTCATAACTACGGTATGGAC  
GTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:25)

Клон 2E7 HC AA (CDR подчеркнуты)

QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLRNNARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSNDEK  
TYSTSLKSRLTISRDTSKGQVLTMTKMDPVDATYYCARIPYYGSGSHNYGMDVWVG  
GTTVTVSS (SEQ ID NO:26)

Клон 2E7 HC AA CDR1: NARMGVSV (SEQ ID NO:17)

Клон 2E7 HC AA CDR2: HIFSNDEKTYSTSLKS (SEQ ID NO:26)

Клон 2E7 HC AA CDR3: IPYYGSGSHNYGMDV (SEQ ID NO:27)

Клон 2E7 LC ДНК

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTC  
ACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGACATTAGAAATGATTTCCGGCTGGTATCAACA  
GAAACCAGGAAAGCCCTCAGCGCCTGCTCTATGCTGCATCCACTTTGCAAAGTGG  
GGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGAGTGGATCTGGGACAGAATCACTCTCACAATCA  
GCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGTATAATACTTACC  
CGTGGACGTTCCGGTCAGGGAACGAAGGTGAAATCAAACGA (SEQ ID NO: 28)

Клон 2E7 LC AA (CDR подчеркнуты)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNDFGWYQKPGKAPQRLLYAASTLQSGVP  
SRFSGSGTEFLTIISLQPEDFATYYCLQYNTYPWTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 29)

044866

Клон 2E7 LC AA CDR1: RASQDIRNDFG (SEQ ID NO: 30)

Клон 2E7 LC AA CDR2: AASTLQS (SEQ ID NO: 31)

Клон 2E7 LHC AA CDR3: LQYNTYPWT (SEQ ID NO: 32)

Клон 8B5 HC ДНК

CAGATACAACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCTGAG  
ACTCTCCTGTGTAGCGTCTGGATTCACCTCAAGAAGCTATGGCATGCACTGGGTCCG  
CCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATTTGGTATGATGGAAGTA  
ATGAATACTATGGAGACCCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACCTCC  
AAGAACATGTTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGATGACACGGCTGTGTA  
TACTGTGCGAGGTCGGGAATAGCAGTGGCTGGGGCCTTTGACTACTGGGGCCAGG  
GAACCTGGTCACCGTCTCTCA (SEQ ID NO: 33)

Клон 8B5 HC AA (CDR подчеркнуты)

QIQLVESGGGVVQPRSLRLSCVASGFTFKNYGMHWVRQAPGKLEWVAVIWDGSN  
EYYGDPVKGRFTISRDNKSNMLYLQMNSLRADDTAVYYCARSGIAVAGAFDYWGQGT  
LVTVSS (SEQ ID NO: 34)

Клон 8B5 HC AA CDR1: NYGMH (SEQ ID NO: 34)

Клон 8B5 HC AA CDR2: VIWYDGSNEYGDPVKG (SEQ ID NO: 35)

Клон 8B5 HC AA CDR3: SGIAVAGAFDY (SEQ ID NO: 36)

Клон 8B5 LC ДНК

GAAATGTGTTGACGCAGTCTCCAGACACCCTGTCTTGTCTCCAGGGGAAAAAGCC  
ACCCTCTCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGCTTCTGGCCTGGTACCAG  
CAGAAACCTGGACAGGCTCCAGTCTCCTCATCTATGTTGCATCCAGAAGGGCCGCT  
GGCATCCCTGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTCACTCTCACCATC  
AGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGAATGTTTACTGTCAACACTATGGTAGGACA  
CCATTCATTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGA (SEQ ID NO: 37)

Клон 8B5 LC AA (CDR подчеркнуты)

EIVLTQSPDTLSLSPGKATLSCRASQSVSSFLAWYQKPGQAPSLIYVASRRAAGIPD  
RFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFGMFYCYHYGRTPFTFGPGTKVDIKR (SEQ ID NO: 41)

Клон 8B5 LC AA CDR1: RASQSVSSFLA (SEQ ID NO: 38)

044866

Клон 8B5 LC AA CDR2: VASRRRAA (SEQ ID NO: 39)

Клон 8B5 LC AA CDR3: QHYGRTPFT (SEQ ID NO: 40)

Клон 4E9 HC ДНК

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAA  
GGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTACCGGCTACTATATACACTGGGTGCG  
ACAGGCCCTGAACAAGGGCTTGAAGTGGATGGGATGGATCAACCCTAACAGTGGTG  
GCACAAACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTACCATGGCCAGGGACACGTCC  
ATCAGCACAGTTTACATGGACCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTA  
TTACTGTGCGAGAATACCGGGTGGTAACTCGGTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAAC  
CCTGGTACCGTCTCTCA (SEQ ID NO: 41)

Клон 4E9 HC AA (CDR подчеркнуты)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYIHVVRQAPEQGLEWMGWINPNSGG  
TNYAQKFQGRVTMARDTSISTVYMDLSRLRSDDTAVYYCARIRGGNSVFDYWGQGL  
VTVSS (SEQ ID NO: 42)

Клон 4E9 HC AA CDR1: GYYIH (SEQ ID NO: 43)

Клон 4E9 HC AA CDR2: WINPNSGGTNYAQKFQG (SEQ ID NO: 44)

Клон 4E9 HC AA CDR3: IRGGNSVFDY (SEQ ID NO: 45)

Клон 4E9 LC ДНК

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCC  
ACCATCAACTGCAAGTCCACCCAGAGTATTTATACACCTCCAACAATAAGAACTTC  
TTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCTAAACTGCTCATTCTCTGGGCA  
TCTATCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGA  
TTTCGCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCA  
ACAATATTTAGTACTATGTTCAAGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACG  
A (SEQ ID NO: 46)

Клон 4E9 LC AA (CDR подчеркнуты)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSTQSILYTSNNKNFLAWYQKPGQPPKLLISWASIR  
ESGVPDRFSGSGGTDFTALTISSLQAEDVAVYYCQQYFSTMFSGQGTGLEIKR (SEQ ID  
NO: 47)

Клон 4E9 LC AA CDR1: KSTQSILYTSNNKNFLA (SEQ ID NO: 48)

044866

Клон 4E9 LC AA CDR2: WASIRES (SEQ ID NO: 49)

Клон 4E9 LC AA CDR3: QQYFSTMFS (SEQ ID NO: 50)

Клон 11F11 HC ДНК

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTC  
CCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTGGTGCATACTACTGGACTTG  
GATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCCATTACAGTG  
GGAGCACCTACTCCAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAATTACCATATCGTTAGACACGT  
CTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAACTCTGTGACTGCCCGGACACGGCCGTGT  
ATTACTGTGCGAGACAAGAGGACTACGGTGGTTTGTGTTGACTACTGGGGCCAGGGA  
ACCCTGGTCACCGTTTCCTCA (SEQ ID NO: 51)

Клон 11F11 HC AA (CDR подчеркнуты)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGAYYWTWIRQHPGKGLEWIGYIHYSGST  
YSNPSLKSRITISLDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARQEDYGGLFDYWGQGLTVTV  
SS (SEQ ID NO: 52)

Клон 11F11 HC AA CDR1: SGAYYWT (SEQ ID NO: 53)

Клон 11F1 HC AA CDR2: YIHYSGSTYSNPSLKS (SEQ ID NO: 54)

Клон 11F1 HC AA CDR3: QEDYGGLFDY (SEQ ID NO: 55)

Клон 11F11 LC ДНК

GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAAT  
CACCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTACCACCGACTTAGCCTGGTACCAGCA  
GATGCCTGGACAGGCTCCCCGGCTCCTCATCTATGATGCTTCCACCAGGGCCACTGG  
TTTCCAGCCAGATTCAGTGGCAGTGGTCTGGGACAGACTTCACGCTACCATCAG  
CAGCCTGCAGGCTGAAGATTTGCAGTTTACTGTCAACATTATAAAACCTGGCC  
TCTCACTTTCGGCGGAGGACTAAGGTGGAGATCAAACGA (SEQ ID NO: 56)

Клон 11F11 LC AA (CDR подчеркнуты)

EIVMTQSPATLSVSPGERITLSCRASQSVTTDLAWYQMPGQAPRLLIYDASTRATGFPA  
RFGSGSGTDFLTISLQAEDFAVYYCQHYKTWPLTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 57)

Клон 11F11 LC AA CDR1: RASQSVTTDLA (SEQ ID NO: 58)

Клон 11F1 LC AA CDR2: DASTRAT (SEQ ID NO: 59)

Клон 11F1 LC AA CDR3: QHYKTWPLT (SEQ ID NO: 60)

Конструкция 10E3 CD28 ДНК (сигнальная последовательность выделена жирным шрифтом)

**ATGGCACTCCCCGTA**ACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCC  
**GCACGCCCGC**AGGTGACCCTCAAAGAGTCTGGACCCGTGCTCGTAAAACCTACGGA  
 GACCCTGACACTCACCTGCACAGTCTCCGGCTTCAGCCTCATCAATGCCAGGATGGG  
 AGTTTCCTGGATCAGGCAACCGCCCGAAAGGCCCTGGAATGGCTCGCACATATTTT  
 CAGTAAACGCTGAAAAAGCTATCGGACTTCTCTGAAAAGTCCGGCTCACGATTAGTA  
 AGGACACATCCAAGAGCCAAGTGGTGCTTACGATGACTAACATGGACCTGTGGAT  
 ACTGCAACCTATTACTGTGCTCGAATCCCTGGTTATGGCGGAAATGGGGACTACCAC  
 TACTACGGTATGGATGTCTGGGGCCAAGGACCACGGTACTGTTTCAAGCGGAGG  
 GGGAGGGAGTGGGGGTGGCGGATCTGGCGGAGGAGGCAGCGATATCCAGATGACG  
 CAGTCCCCTAGTTCACTTCCGCATCCCTGGGGATCGGGTTACCATTACATGCCGC  
 GCGTCACAGGGTATCCGGAATGATCTGGGATGGTACCAGCAGAAGCCGGGAAAGGC  
 TCCTAAGCGCCTCATCTACGCCAGCTCCACCCTGCAGAGTGGAGTGCCTCCCGGTT  
 TTCAGGCAGTGGCTCCGGTACGGAGTTTACTCTTACAATTAGCAGCCTGCAGCCAGA  
 AGATTTTGCAACTTACTACTGTTTGCAGCATAATAATTTCCCTGGACCTTTGGTCAG  
 GGCACCAAGGTGGAGATCAAAGAGCAGCCGCATCGAAGTAATGTATCCCCCCCC  
 GTACCTTGACAATGAGAAGTCAAATGGAACCATTTATCCATGTTAAGGGCAAAACCC  
 TCTGCCCTTCTCCACTGTTCCCTGGCCCTAGTAAGCCGTTTTTGGGTGCTGGTGGTAGT  
 CGGTGGGGTGTGGCTTGTACTCTTCTCTCGTGACCGTCGCCTTTATAATCTTTTGG  
 GTCAGATCCAAAAGAAGCCGCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACG  
 CCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTCCG  
 TGCTATCGGAGCCGAGTGAATTTTCTAGATCAGCTGATGCTCCCGCCTATCAGCA  
 GGGACAGAATCAACTTTACAATGAGCTGAACCTGGGTTCGAGAGAAGAGTACGACG  
 TTTTGGACAAACGCCGGGGCCGAGATCCTGAGATGGGGGGGAAGCCGAGAAGGAA  
 GAATCCTCAAGAAGGCCTGTACAACGAGCTTCAAAAAGACAAAATGGCTGAGGCCT  
 ACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGACGAGGCAAGGGTACGATGGCTTG  
 TATCAGGGCCTGAGTACAGCCACAAGGACACCTATGACGCCCTCCACATGCAGGC  
 ACTGCCCCACGCTAG (SEQ ID NO: 61)

Конструкция 10E3 CD28 AA (сигнальная последовательность выделена жирным шрифтом; CDR подчеркнуты)

**MALPVTALLPLALLHAARPQVTLKESGPVLVKPTETLTLCTVSGFSLINARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSNAEKSYRTSLKSRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDTATYYCARIPGYGGNGDYHYGMVWVWQGTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSL SASLGDRTITCRASQGIRNDLGWYQKPGKAPKRLIYASSTLQSGVPSRFSGSGSGETFTLTISLQPEDFATYYCLOHNNFPWTFGQGTKVEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIHHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFVWLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 62)**

Конструкция 10E3 CD28T ДНК (сигнальная последовательность выделена жирным шрифтом)

**ATGGCACTCCCGTAACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCC  
GCACGCCCGCAAGTTACTTTGAAGGAGTCTGGACCTGACTGGTGAAGCCAACCGA  
GACTGACACTACGTGTACAGTGAGTGGTTTTTCCTTGATCAACGCAAGGATGGG  
CGTCAGCTGGATCAGGCAACCCCTGGCAAGGCTCTGGAATGGCTCGCTCACATATT  
CAGCAATGCCGAAAAAGCTACCGACAAGCCTGAAATCCCGCCTGACTATTTCCA  
AGGACACTTCTAAGTCTCAGGTGGTGTGACCATGACCAACATGGACCCGGTGGAC  
ACCGCCACCTATTACTGCGCAAGAATCCCTGGGTATGGTGGGAATGGTGACTACCAT  
TATTATGGGATGGATGTGTGGGGCAAGGCACAACCGTAACGGTCTCAAGCGGTGG  
GGGAGGCTCAGGGGCGGAGGCTCCGGAGGTGGCGGCTCCGACATTCAGATGACCC  
AAAGCCCGTCCAGCCTGTCCGCCAGCCTGGGAGATAGAGTGACAATCACGTGTAGA  
GCTTCCCAAGGGATAAGAAATGATCTCGGTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAAGC  
CCCCAAAAGGCTTATATATGCTAGTAGTACACTGCAGTCTGGAGTTCCTTCCCGATT  
TTCAGGTAGCGGCTCCGGTACAGAGTTCACCTCACGATAAGCTCACTCCAGCCTGA  
GGATTCGCAACGTACTACTGCCTCCAGCACAACAATTTCCCTGGACTTTCGGCCA  
GGCACC AAGGTGGAGATCAAGAGGGCCGCTGCCCTTGATAATGAAAAGTCAAACG  
GAACAATCATTACGTGAAGGGCAAGCACCTCTGTCCGTACCCCTTGTCCCTGGTC  
CATCCAAGCCATTCTGGGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGAGTCTCCTCGCTTGTACTCTCT  
GCTCGTACCCGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTAGATCCAAAAGAAGCCCGCTGCT  
CCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCCCCTGGCCCCACAAGGAAACT  
ACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTGCTGCCTATCGGAGCCGAGTGAAATTTT  
CTAGATCAGCTGATGCTCCCGCTATCAGCAGGGACAGAATCAACTTTACAATGAGC  
TGAACCTGGGTCGACAGAGAAGAGTACGACGTTTTGGACAAAACCGGGGGCCGAGAT  
CCTGAGATGGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAATCTCAAGAAGGCTGTACAACG**

AGCTTCAAAAAGACAAAATGGCTGAGGCGTACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAG  
 CGGAGACGAGGCAAGGGTCACGATGGCTTGTATCAGGGCCTGAGTACAGCCACAAA  
 GGACACCTATGACGCCCTCCACATGCAGGCACTGCCCCACGCTAG (SEQ ID NO: 63)

Конструкция 10E3\_CD28T\_AA (сигнальная последовательность выделена  
 жирным шрифтом, CDR подчеркнуты)

**MALPVTALLLPLALLLHAARP**QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLIN**ARMGVS**  
 WIRQPPGKALEWLA**HIFSNAEKSYRTSLK**SRLTISKDTSKSQVVLTMNMDPVDTATYY  
 CAR**IPGYGGNGDYHYYGMDV**WGQGTTVTVSSGGGGSGGGGGGGSDIQMTQSPSSL  
 SASLGDRVTITCR**ASQGIRNDL**GWYQKPGKAPKRLIY**ASSTLQ**SGVPSRFSGSGSGTEF  
 TLTISSLQPEDFATYY**CLQHNNFPW**TFGQGTKVEIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCP  
 SPLFPGPSKPFVVLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFWVRSKR**SRL**LHSDYMNMPRRRPGP  
 TRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR  
 RGRDPEMGGKPRRN**POE**GLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRR**RG**KGHDGLYQGLST  
 ATKDITYDALHM**QALPPR** (SEQ ID NO: 64)

Конструкция 10E3\_CD8\_ДНК (сигнальная последовательность выделена  
 жирным шрифтом)

**ATGGCACTCCCCGTA**ACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCC  
**GCACGCCCG**CAGGTGACACTCAAGGAATCAGGGCCCGTACTGGTGAAACCTACTG  
 AGACCCTGACACTGACTTGACCCGTCTGGGTCTCTCTGATTAACGCTCGAATGG  
 GTGTGAGTTGGATACGCCAGCCTCCAGGAAGGCTCTGGAGTGGTTGGCCACATTT  
 TCTCCAACGCCGAGAAGAGCTACAGGACTAGTCTGAAGTCCAGACTTACCATTCCA  
 AAGACACAAGTAAATCACAGGTGGTGCTGACAATGACAAACATGGACCCGGTTGAT  
 ACTGCTACCTATTATTGTGCCCGCATTCCCGGCTACGGCGGCAATGGCGACTATCAC  
 TATTATGGTATGGATGTCTGGGGCAGGGGACCACTGTTACCGTGTCCAGCGGGGT  
 GGTGGCAGCGGAGGTGGAGGGAGCGGTGGTGGGGGAGTGATATTCAGATGACCC  
 AGAGCCCTAGCTCTCTTTCCGCTTCTCTGGGCGATAGAGTACCATCACCTGCCGGG  
 CCTCTCAAGGCATCCGGAACGATCTTGGATGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCA  
 CAAAAAGGCTGATCTACGCATCAAGCACCTGCAATCTGGGGTGCCGTCCCGGTTT  
 TCTGGTTCTGGTAGTGGACCGAGTTACTCTGACTATTTCTCCCTGCAGCCTGAGG  
 ACTTTGCTACGTAATTTGTCTGCAGCATAACAACCTCCCCTGGACGTTCCGGGCAGG  
 GTACGAAAGTGAAATTAAGCGCGCCGCCCTGTCCAACCTCATTATGATTTCT  
 CTCATTTGTCCCAGTGTCTGCCCCTAAACCCACAACACTCCGGCGCCCCGAC  
 CGCCAACCTCCGCACCTACCATCGCAAGCCAGCCATTGAGCCTCCGACCTGAGGCAT  
 GTAGACCAGCAGCCGGCGGTGCCGTGCACACAAGGGGACTGGATTTCCCTGCGAC

ATATATATTTGGGCCCTCTGGCTGGAACCTGTGGGGTTCTGCTGCTCTCTCGTTA  
 TTACACTGTATTGCAATCATCGCAATAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCG  
 ATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTT  
 ACGCACCTAGAGATTTGCTGCCTATCGGAGCCGAGTGAAATTTCTAGATCAG  
 CTGATGCTCCCCCTATCAGCAGGGACAGAATCAACTTTACAATGAGCTGAACCTGG  
 GTCGCAGAGAAGAGTACGACGTTTTGGACAACGCCGGGGCCGAGATCCTGAGATG  
 GGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAATCCTCAAGAAGGCCTGTACAACGAGCTTCAA  
 AAGACAAAATGGCTGAGGCGTACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGACG  
 AGGCAAGGGTCACGATGGCTGTATCAGGGCCTGAGTACAGCCACAAAGGACACCT  
 ATGACGCCCTCCACATGCAGGCACTGCCCCACGCTAG (SEQ ID NO: 65)

Конструкция 10E3 CD8 AA (сигнальная последовательность выделена  
 жирным шрифтом; CDR подчеркнуты)

**MALPVTALLPLALLHAARP**QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLIN**ARMGVS**  
 WIRQPPGKALEWLAH**IFSN**AEKSYRTSLK**SRL**TISKDTSKSKQVVLMTNMDPVDATYY  
 CAR**IPGYGGNGDYHY**YGM**DV**WGQTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSL  
 SASLGDRVTITC**RASQ**GIRNDL**GWY**QKPGKAPKRLIY**ASSTLQ**SGVPSRFSGSGSGTEF  
 TLTISSLQPEDFATYY**CLQH**NFPWTFGQGTKVEIKRAAALSNSIMYFSHFVVPFLPAKP  
 TTPAPRPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLL  
 SLVITLYCNHRNRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSR  
 SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ  
 KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID  
 NO: 66)

Конструкция 8B5 CD28 ДНК (сигнальная последовательность выделена  
 жирным шрифтом)

**ATGGCACTCCCGTAACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCC**  
**GCACGCCC**GCAGATCCAGTTGGTGAATCAGGGGGCGGTGGTGCAGCCGGGTA  
 GGAGCCTGAGACTGTCATGCGTGGCGTCTGGCTTACATTCAAGAACTACGGCATGC  
 ACTGGGTGCGACAGGCCCCGGAAAGGGTTGGAGTGGGTGCGCCGTGATCTGGTAC  
 GACGGATCTAATGAGTATTACGGAGATCCTGTGAAGGGAAGGTTACCATCTCCCG  
 CGACAATAGCAAAAATATGCTCTACCTGCAAAATGAACTCACTCAGGGCGGATGATA  
 CGGGCGTCTACTATTGCGCTCGCTCAGGGATTGCTGTGGCCGGCGCATTCGATTACT  
 GGGGACAGGGTACCCTGGTGACAGTATCAAGCGGAGGCGGGGCTCTGGCGGGGG  
 GGATCTGGCGGGGGGAAGTGAGATTGTGTTGACACAGTCTCCCGATACCCCTGTC

ACTGTCACCCGGCGAGAAGGCAACGCTGAGTTGCAGAGCAAGCCAGTCAGTCTCCT  
 CTCTTTTCTGGCCTGGTATCAGCAAAAACCAGGTCAGGCACCATCTCTCCTGATTTA  
 CGTTGCCAGCAGACGGGGCGGTGGCATTCCCGACAGGTTCTCTGGAAGCGGATCTG  
 GGACCGATTTTACCCTGACAATTAGCCGCTTGGAGCCCGAAGACTTTGGTATGTTTT  
 ACTGCCAGCACTACGGAAGGACACCTTTCACATTTGGCCCGGGCACGAAAGTCGAT  
 ATAAAACGCGCAGCCGCCATTGAAGTAATGTACCCACCACCTTATTTGGACAATGA  
 AAAGTCCAATGGTACCATTATTCACGTC AAGGGAAGCATCTCTGTCCAAGCCCTCT  
 GTCCCCGGCCCTCCAACCATTCTGGGTGCTGGTGGTCTGCGGGCGGAGTTCTGGC  
 CTGCTATCTCTGCTCGTGACTGTTGCATTCATCTTTCTGGGTGAGATCCAAAAGA  
 AGCCGCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACA  
 AGGAAACTACTACGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTCTGCTGCCTATCGGAGCCG  
 AGTGAAATTTCTAGATCAGCTGATGCTCCCGCTATCAGCAGGGACAGAATAACT  
 TTACAATGAGCTGAACCTGGGTGCGAGAGAAGAGTACGACGTTTTGGACAAACGCC  
 GGGGCCGAGATCCTGAGATGGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAATCCTCAAGAAGG  
 CCTGTACAACGAGCTTCAAAAAGACAAAATGGCTGAGGCGTACTCTGAGATCGGCA  
 TGAGGGCGAGCGGAGACGAGGCAAGGGTACGATGGCTTGTATCAGGGCCTGAGT  
 ACAGCCACAAGGACACCTATGACGCCCTCCACATGCAGGCACTGCCCCACGCTA  
 G (SEQ ID NO: 67)

Конструкция 8B5 CD28 AA (сигнальная последовательность выделена  
 жирным шрифтом)

**MALPVTALLPLALLHAARP**QIQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFKNYGMHW  
 VRQAPGKLEWVAVIWYDGSNEYYPVKGRFTISRDNKSNMLYLQMNSLRADDTAV  
 YYCARSGIAVAGAFDYWGQGLVTVSSGGGGGGGGGGGGSEIVLTQSPDTLSLSPGE  
 KATLSCRASQSVSSFLAWYQKPGQAPSLLIYVASRRAAGIPDRFSGSGSDTFTLISR  
 LEPEDFGMFYCYHYGRTPFTFGPGTKVDIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGK  
 HLCPSLPLFPGPSKPFVWLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSLHSDYMNMTPR  
 RPPGTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLRREEYDVL  
 DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDLVQ  
 GLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 68)

Конструкция 8B5 CD28T ДНК (сигнальная последовательность выделена  
 жирным шрифтом)

**ATGGCACTCCCGTAACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCC  
 GCACGCCCGCAGATTCAGCTCGTGGAGTCAGGTGGTGGCGTGGTTCAGCCCGGACG  
 GTCCCTGCGACTCTCTGTGTGGCAAGCGGATTTACCTTTAAGAACTATGGCATGCA**

CTGGGTGAGGCAGGCCCTGGAAAAGGACTGGAGTGGGTTGCTGTGATCTGGTACG  
 ACGGGTCCAACGAATATTATGGCGATCCTGTGAAGGGACGGTTACAATCTCACGC  
 GATAACTCAAAGAACATGCTGTACCTGCAATGAACTCTCTGCGCGTGTATGACT  
 GCCGTGTATTATTGCGCTCGGAGTGGTATCGCCGTCGCAGGAGCATTGATTATTGG  
 GGGCAAGGGACCTCGTGACAGTGAGTTCGGAGGGGGAGGTTCTGGTGGAGGCGG  
 CTCTGGTGGGGAGGCAGCGAGATCGTTCTGACCCAGTCTCCTGACACACTGTCAC  
 GTCCCCTGGTAAAAGGCCACTGTCTTGTAGAGCGTCCCAGAGCGTTTCCAGTTC  
 CTTCCTGTCATGGTATCAACAAAACCCGGGCAGGCTCCAAGCTTGCTGATCTACGT  
 GGCCAGCCCGGGCCGAGGCATCCCTGATAGTTTAGCGGTTCTGGGAGCGGGA  
 CGGACTTCACCTTGACAATATCACGGCTGGAACCCGAAGACTTCGGAATGTTTATT  
 GCCAGCACTACGGAAGAACTCCATTACCTTTGGCCCGGAACGAAGGTAGACATC  
 AAGAGAGCAGCAGCCCTCGACAACGAGAAATCCAATGGAACCATTATCCATGTGAA  
 GGGGAAACATCTCTGCCCTCACCTATTGTTCCCTGGACCCAGCAAGCCTTTTTGGGT  
 TCTGGTCTGGTGGGGGGCGTCTGGCTTGTACTCCCTCCTCGTTACAGTCGCCTTC  
 ATAATCTTTGGGTTAGATCCAAAAGAAGCCGCTGCTCCATAGCGATTACATGAAT  
 ATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACTACCAGCCTTACGCACCACCT  
 AGAGATTTGCTGCCTATCGGAGCCGAGTGAAATTTTCTAGATCAGCTGATGCTCCC  
 GCCTATCAGCAGGGACAGAATCACTTTACAATGAGCTGAACCTGGGTCGAGAGA  
 AGAGTACGACGTTTTGGACAAAACGCCGGGGCCGAGATCCTGAGATGGGGGGGAAGC  
 CGAGAAGGAAGAATCCTCAAGAAGGCTGTACAACGAGCTTCAAAAAGACAAAAT  
 GGCTGAGGCGTACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGACGAGCAAGGGT  
 CACGATGGCTTGTATCAGGGCCTGAGTACAGCCACAAGGACACCTATGACGCCCT  
 CCACATGCAGGCACTGCCCCACGCTAG (SEQ ID NO: 69)

Конструкция 8B5 CD28T AA (сигнальная последовательность выделена  
 жирным шрифтом)

**MALPVTALLPLALLHAARP**QILVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFKNYGMHW  
 VRQAPGKLEWVAVIWDGSNEYYGDPVKGRFTISRDNNSKNMLYLQMNSLRADDTAV  
 YYCARSGIAVAGAFDYWGQTLTVSSGGGGGGGGGGGGSEIVLTQSPDTLSLSPGE  
 KATLSCRASQSVSSFLAWYQKPGQAPSLLIYVASRRAAGIPDRFSGSGSDFTLTISR  
 LEPEDFGMFYQHYGRTPFTFGPGTKVDIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFP  
 PSKPFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSLHSDYMNMTPRRPGPTRKH  
 QPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPE  
 MGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDT  
 YDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 70)

Конструкция 8B5 CD8 ДНК (сигнальная последовательность выделена

жирным шрифтом)

**ATGGCACTCCCCGTA**ACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCC  
**GCACGCCCCG**CAGATACAGCTTGTCTGAATCCGGTGGCGGGTGGTGCAGCCTGGAC  
 GCAGCCTGCGGCTTTCTTGGCTGGCCAGCGGATTTACCTTCAAGAACTACGGGATGC  
 ATTGGGTCCGCCAGGCACCCGGCAAAGGCCTTGAGTGGGTTGCAGTGATCTGGTAC  
 GACGGCAGTAACGAGTATTATGGCGACCCCGTGAAGGGAAGGTTTACTATTTCAAG  
 AGATAATAGTAAGAACATGTTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCGGACGACA  
 CTGCCGTGTACTACTGTGCTCGCTCCGGCATCGCTGTGGCAGGGGCCTTTGACTACT  
 GGGGTACGGGACGCTGGTACCGTTAGTTCCGGGGCGGTGGTCCGGAGGAGGC  
 GGTTCGGCGGGCGGATCAGAAATCGTTCTTACTCAGAGTCCCAGATACGCTGTCC  
 TTGTCTCCGGGAGAAAAGCCACACTGAGCTGCCGAGCCTCACAGTCAGTAAGTTCT  
 TCATTCCTCGCCTGGTACCAGCAAAAACCGGGCAGGCCCTTCCCTGCTTATCTAC  
 GTGGCCTCTAGGAGAGCCCGGTATTCTGACCGGTTACAGCGAAGTGGTCCGG  
 GACTGATTTTACGCTCACGATCTCCCGATTGGAGCCCGAGGATTTCCGGATGTTCTA  
 CTGTACAGCATTATGGAAGAACGCCCTTACCTTCGGTCCGGGAACAAAGGTTGATAT  
 TAAGCGGGTGTGTCCTTAGCAACTCCATCATGTATTTTCTCACTTCGTGCCAGTA  
 TTCCTGCCAGCCAAACCGACCACAACCCAGCACCTAGACCTCCTACTCCCGTCCC  
 ACCATAGCTTACAGCCGCTGAGTTTGAGGCCAGAGGCCTGTGGCCTGCTGCAGGC  
 GGAGCAGTTCACACCAGGGGACTTGACTTTGCATGTGACATCTATATTTGGGTCCA  
 CTGGCGGGAACCTGCGGGGTGCTCCTTTTGTCACTCGTTATCACACTGTATTGCAAT  
 CATAGGAATAGATCCAAAAGAAGCCGCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGAC  
 TCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAG  
 ATTTGCTGCCTATCGGAGCCGAGTGAAATTTCTAGATCAGCTGATGCTCCCGCCT  
 ATCAGCAGGGACAGAATCAACTTTACAATGAGCTGAACCTGGGTGCGAGAGAAGAG  
 TACGACGTTTTGGACAAACCGGGCCGAGATCCTGAGATGGGGGGAAGCCGAG  
 AAGGAAGAATCCTCAAGAAGGCCTGTACAACGAGCTTCAAAAAGACAAAATGGCTG  
 AGGCGTACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGACGAGGCAAGGGTCACGA  
 TGGCTTGATCAGGGCCTGAGTACAGCCACAAAGGACACCTATGACGCCCTCCACAT  
 GCAGGCACTGCCCCACGCTAG (SEQ ID NO: 71)

Конструкция 8B5 CD8 AA (сигнальная последовательность выделена

жирным шрифтом)

**MALPVTALLPLALLHARP**QIQLVESGGGVVQPGRSLRLSCV ASGFTFKNYGMHW  
 VRQAPGKLEWVAVIWYDGSNEYYPVKGRFTISRDN SKNMLYLQMN SLRADD TAV

YYCARSGLAVAGAFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPDTLSLSPGE  
 KATLSCRASQSVSSFLAWYQKPGQAPSLLIYVASRRAAGIPDRFSGSGSDFTLTISR  
 LEPEDFGMFYQCQHYGRTPTFTGPGTKVDIKRAAALSNSIMYFHFVVPVFLPAKPTTTPAP  
 RPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCGVLLLSLVITL  
 YCNHRNRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAP  
 AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM  
 AEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 72)

Конструкция 4E9 CD28 ДНК (сигнальная последовательность выделена  
 жирным шрифтом)

**ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCC**  
**GCACGCCCGCAGGTGCAGCTGGTGCAGAGTGGGGCAGAAGTAAAGAAGCCCTGGTG**  
 CCTCTGTCAAAGTTAGTTGCAAAGCATCTGGGTATACTTTCACCGGTTACTATATCC  
 ATTGGGTTCCGGCAGGCCCGGAGCAGGGACTGGAGTGGATGGGCTGGATCAACCCA  
 AATTCAGGCGGCACTAACTATGCTCAAAAAGTTCCAGGGCAGGGTCACAATGGCCCG  
 GGATACTCAATTAGCACCGTCTATATGGATCTTAGTCGGCTGCCAGTGACGATAC  
 CGCTGTCTACTATTGCGCAAGGATCAGGGGCGGCAATTCTGTTTTTACTATTGGGG  
 CCAGGGAACACTGGTGACCGTCTCCTCTGGTGGAGCGGTAGTGGTGGAGCGGGT  
 CCGGAGGAGGGGCTCCGATATAGTGATGACTCAAAGTCCCGATAGCTTGGCAGTA  
 TCTCTGGGGAACCGCCACTATTAAGTAAATCCACCCAGTCCATTCTCTATACCT  
 CTAACAACAAGAATTTCTCGCGTGGTATCAGCAAAAACCCGGGCAGCCACCTAAA  
 CTGCTTATATCTGGGCCAGCATCAGGGAGTCCGGCGTCCCTGATCGGTTACGCGGT  
 AGTGGCAGCGGGACAGACTTCGCTCTGACCATCAGTAGCCTCCAGGCTGAAGATGT  
 CGCAGTGTATTATTGCCAGCAGTACTTCAGCACGATGTTTAGCTTCGGGCAGGGAAC  
 CAAGCTGGAATAAAGAGAGCTGCAGCAATCGAGGTGATGTACCCACCTCCATATC  
 TGGACAATGAAAAGTCCAATGGCACTATCATAACGTAAGGGCAACACCTGTGT  
 CCATCTCCACTTTCCCGGGCCCGTCTAAACCTTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGC  
 GGAGTTCTGGCCTGTTATTACTGCTGGTCACCGTGGCTTTCATATTTTTGGGTAA  
 GATCCAAAAGAAGCCGCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGC  
 CCTGGCCCCACAAGGAAACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTGCTGCC  
 TATCGGAGCCGAGTGAATTTCTAGATCAGCTGATGCTCCCGCTATCAGCAGGGA  
 CAGAATCAACTTTACAATGAGCTGAACCTGGGTCGAGAGAAGAGTACGACGTTTT  
 GGACAAACGCCGGGCCGAGATCTGAGATGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAAT  
 CCTCAAGAAGGCCTGTACAACGAGCTTCAAAAAGACAAAATGGCTGAGGCGTACTC  
 TGAGATCGGCATGAAGGGCAGCGGAGACGAGGCAAGGGTCACGATGGCTTGTATC

AGGGCCTGAGTACAGCCACAAAGGACACCTATGACGCCCTCCACATGCAGGCACTG  
CCCCACGCTAG (SEQ ID NO: 73)

Конструкция 4Е9 CD28 АА (сигнальная последовательность выделена  
жирным шрифтом)

**MALPVTALLLPLALLHAARP**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYIHW  
VRQAPEQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMARDTSISTVYMDLSRLRSDDTAV  
YYCARIRGGNSVFDYWGQGLVTVSSGGGGGGGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGE  
RATINCKSTQSILYTSNNKNFLAWYQQKPGQPPKLLISWASIRESGVPDRFSGSGSGTDF  
ALTISSLQAEDVAVYYCQQYFSTMFSFGQGTKLEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEK SNGTII  
HVKGKHLCPSPFPGPSKPFWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYM  
NMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSR VKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRRE  
EYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRKGH  
DGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR (SEQ ID NO: 74)

Конструкция 4Е9 CD28Т ДНК (сигнальная последовательность выделена  
жирным шрифтом)

**ATGGCACTCCCGTAACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCC**  
**GCACGCCCGC**AGGTACAGCTGGTGCAGAGCGGGCCGAGGTCAAAAAGCCCGGG  
CTTCAGTTAAGTTAGCTGCAAGGCTTCCGGCTACACCTTTACCGTTACTATATTTCA  
CTGGGTTAGACAGGCACCTGAGCAAGGACTGGAGTGGATGGGGTGGATTAACCCCA  
ATAGCGGTGGGACCAACTACGCCAGAAGTTCAAGGCCGAGTGACAATGGCACGA  
GACACCTCCATTTCCACTGTGTACATGGA CTGAGCCGCCTCAGGTCAGACGACACC  
GCAGTGTACTACTGTGCGGAATCCGGCGCGAAACAGCGTGTTTGACTACTGGGG  
TCAGGGCACGTTGGTGACCGTGTCTTCCGGAGGGGGGGGATCTGGTGGCGGGGCT  
CCGGCGGAGGCGGTAGTGATATTGTGATGACTCAGTCACCGGACAGTCTTGCTGTTT  
CACTTGGTGAGAGGGCCACCATAAATTGTAAGCAGCCAGAGCATTCTCTACACA  
TCTAACAAACAAAATTTCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGACAGCCACCCAA  
ATTGCTGATTAGCTGGGCCAGCATTGAGAATCTGGGGTTCCGGACCGCTTTCCGG  
GTCTGGCTCTGGGACCGACTTCGCTTTGACCATAAGCTCTTTCAGGCCGAAGACGT  
CGCAGTATACTATTGTCAACAGTATTTTTCTACCATGTTTTCTTCGGCCAGGGAACT  
AAGTTGGAGATCAAGAGAGCAGCTGCATTGGATAATGAGAAGTCCAATGGCACTAT  
TATCCACGTGAAAGGTAACACCTGTGTCCCTCACCCCTGTTCCAGGACCTAGTAA  
ACCATTTGGGCTTTGGTTGTAGTCGGGGCGTTTTGGCATGTTATCCCTTCTGTG  
ACAGTCGCCTTTATCATTTTCTGGGTGAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGC  
GATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCC

TTACGCACCACCTAGAGATTTGCTGCCTATCGGAGCCGAGTGAAATTTTCTAGATC  
 AGCTGATGCTCCCGCTATCAGCAGGGACAGAATCACTTTACAATGAGCTGAACCT  
 GGGTTCGACAGAGAAGAGTACGACGTTTTGGACAAACGCCGGGGCCGAGATCCTGAGA  
 TGGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAATCTCAAGAAGGCCTGTACAACGAGCTTCA  
 AAAAGACAAAATGGCTGAGGCGTACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGA  
 CGAGGCAAGGGTCACGATGGCTTGTATCAGGGCCTGAGTACAGCCACAAAGGACAC  
 CTATGACGCCCTCCACATGCAGGCACTGCCCCACGCTAG (SEQ ID NO: 75)

Конструкция 4Е9 CD28Т АА (сигнальная последовательность выделена  
 жирным шрифтом)

**MALPVTALLLPLALLLHAARP**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYYIHW  
 VRQAPEQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMARDTSISTVYMDLSRLRSDDTAV  
 YYCARIRGGNSVFDYWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGE  
 RATINCKSTQSILYTSNNKNFLAWYQKPGQPPKLLISWASIRESGVPDFRSGSGSDF  
 ALTISSLQAEDVAVYYCQYFSTMFSGQGTKLEIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCP  
 SPLFPGPSKPFVVLVVGGVLACYLLVTVAFIIFWVRSKRRLHSDYMNMTPRRPGP  
 TRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDRK  
 RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLST  
 ATKDITYDALHMQUALPPR (SEQ ID NO: 76)

Конструкция 4Е9 CD8 ДНК (сигнальная последовательность выделена  
 жирным шрифтом)

**ATGGCACTCCCCGTA**ACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCC  
**GCACGCCCGCA**AGTTCAGCTTGTGCAGAGCGGAGCTGAGGTGAAAAACCAGGGC  
 CCTCCGTTAAGGTGTCTTGCAAAGCCAGCGGATACACATTTACCGGTAATATATTC  
 ACTGGGTGAGGCAGGCCCTGAACAGGGCCTGAATGGATGGGGTGGATCAATCCA  
 AATTCGGGGGAACCAATTATGCTCAGAAATTCAGGGCAGAGTGACAATGGCCAG  
 GGACACCTCAATCAGCACAGTCTACATGGACCTGAGCCGCTGAGGTCTGATGACA  
 CAGCCGTCTACTACTGTGCCCGGATCAGAGGGGAAACAGTGTCTTCGACTATTGGG  
 GGCAGGGAACCCTGGTGAAGTCTCTCCGGGGGAGGGGTAGCGGGGAGGCGGC  
 AGCGGGCGGGGTGGTTCTGACATTGTTATGACCCAATCCCCAGACTCTCTGGCCGTG  
 AGCCTGGGTGAGAGAGCCACCATCAATTGCAAGTCCACCCAGAGCATACTCTATAC  
 GTCAAACAATAAGAATTTCTGGCGTGGTATCAGCAAAAGCCGGGTCAACCACCA  
 AGTTGTTGATTAGCTGGGCATCAATTCGAGAATCTGGCGTCCCTGATAGGTTAGCG  
 GGAGCGGTAGTGGAACCGACTTTGCGCTGACCATTTCATCCCTCAGGCAGAGGAC

GTGGCTGTGTATTACTGTCAACAGTACTTCAGCACGATGTTTTCTTTCGGCCAGGGG  
 ACGAAGCTGGAGATAAAGCGGGCCGAGCACTCAGCAACAGCATCATGTACTTTTC  
 TCATTTCTGCCAGTTTTTCTCCCCGCAAACCCACCACTACCCTGCTCCTAGGCCT  
 CCCACTCCCGCACCCACCATTGCTTCCCAACCTCTGTCATTGAGGCCCGAAGCCTGC  
 AGACCTGCCGAGGAGGGGCTGTGCACACCCGCGGTCTGGATTTTGTGTGATATC  
 TACATTTGGGCCCTTTGGCCGGAACCTGCGGAGTGTGTTGTGCTGAGCCTTGTATC  
 ACGTTGTAAGTACAGAAAACAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGA  
 TTACATGAATATGACTCCACGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTA  
 CGCACCACTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCCGAGTAAAATTTCTAGATCAGC  
 TGATGCTCCCGCTATCAGCAGGGACAGAATCAACTTACAATGAGCTGAACCTGG  
 GTCGCAGAGAAGAGTACGACGTTTTGGACAAACGCCGGGGCCGAGATCCTGAGATG  
 GGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAATCCTCAAGAAGGCCTGTACAACGAGCTTCAA  
 AAGACAAAATGGCTGAGGCGTACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGACG  
 AGGCAAGGGTACGATGGCTTGTATCAGGGCCTGAGTACAGCCACAAAGGACACCT  
 ATGACGCCCTCCACATGCAGGCACTGCCCCACGCTAG (SEQ ID NO: 77)

Конструкция 4E9 CD8 AA (сигнальная последовательность выделена  
 жирным шрифтом)

**MALPVTALLPLALLHAARPQVLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYYIHW**  
 VRQAPEQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMARDTSISTVYMDLSRLRSDDTAV  
 YYCARIRGGNSVFDYWGGTLVTVSSGGGGSGGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGE  
 RATINCKSTQSILYTSNNKNFLAWYQKPGQPPKLLISWASIRESGVPDRFSGSGSDF  
 ALTISSLAEDVAVVYCOQYFSTMFSGQGTKLEIKRAAALSNSIMYFSHFVPVFLPAKP  
 TTTAPRPPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLL  
 SLVITLYCNHRNRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSR  
 SADAPAYQQGQNLYNELNLGRREYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ  
 KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR (SEQ ID  
 NO: 78)

Конструкция 11F11 CD28 ДНК (сигнальная последовательность выделена  
 жирным шрифтом)

**ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCC**  
**GCACGCCCCG**AGGTGCAGCTCCAAGAGTCAGGACCAGGACTTGTCAAACCAAGCC  
 AGACCCTCAGCCTTACCTGCACCGTCAGCGGGGCTCCATCAGCTCTGGGGCTTACT  
 ACTGGACATGGATACGACAGCATCCCGGTAAGGTCTGGAGTGGATCGGGTACATA

CACTATAGTGGTTCCACATATTCTAATCCATCTCTTAAGAGTCGAATTACAATTCAC  
 TCGATACTTCAAAGAATCAGTTCAGCTTGAAACTGAACTCCGTGACCGCGGTGACA  
 CCGCCGTGACTACTGTGCACGCCAAGAGGATTATGGCGGACTGTTTCGATTATTGGG  
 GGCAGGGAACCTCTCGTGACAGTAGCTCCGGCGGGGCGGCAGCGGTGGGGTGG  
 AAGTGGTGGAGGGGCGAGCAGATCTGATGACCCAGAGTCCGCCACTGTACG  
 TGAGTCTGGGGAGCGAATCACACTTCTGTGCGAGCGTCTCAGTCCGTGACCACGG  
 ACCTGGCGTGGTACCAGCAGATGCCAGGCCAGGCCCAAGACTCCTGATCTACGAC  
 GCTTCTACCCGCGCTACTGGTTTCCCGCCAGATTCTCCGGAAGCGGGTCCGGGACG  
 GATTTTACACTTACCATCTTTCATTGCAGGCTGAGGATTTTGGCGTGTACTACTGTC  
 AGCATTACAAAACCTGGCCCTCACTTTCGGGGGCGGAACAAAAGTGGAAATTA  
 CGGGCAGCAGCTATTGAGGTGATGATCCACCCCTACCTGGACAACGAGAAATC  
 CAATGGCACCATCCACGTTAAGGGTAAGCAGTTGTGTCCCTCACCCTCTTCCC  
 TGGGCTAGCAAGCCATTCTGGGTCTGGTGGTCTGGGAGGCGTGTGGCCTGCTA  
 TTCCTCTGGTTACCGTTGCCTTTATCATATTTGGGTCAGATCCAAAAGAAGCCGC  
 CTGTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCCTGGCCCCACAAGGAAA  
 CACTACCAGCCTTACGACCACCTAGAGATTTGCTGCCTATCGGAGCCGAGTGAAA  
 TTTCTAGATCAGCTGATGCTCCCGCTATCAGCAGGGACAGAATCAACTTTACAAT  
 GAGCTGAACCTGGGTCGAGAGAAGAGTACGACGTTTTGGACAACCGCGGGGCCG  
 AGATCCTGAGATGGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAATCCTCAAGAAGGCCTGAC  
 AACGAGCTTCAAAAAGACAAAATGGCTGAGGCGTACTCTGAGATCGGCATGAAGGG  
 CGAGCGGAGACGAGGCAAGGGTACGATGGCTTGATCAGGGCCTGAGTACAGCCA  
 CAAAGGACACCTATGACGCCCTCCACATGCAGGCACTGCCCCACGCTAG (SEQ ID  
 NO: 79)

Конструкция 11F11 CD28 AA (сигнальная последовательность выделена  
 жирным шрифтом)

**MALPVTALLPLALLHAARPQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGAYYWT**  
 WIRQHPGKLEWIGYIHYSYSTYNSPLKSRITISLDTSKNQFSLKLNSTVAADTAVYYC  
 ARQEDYGGFLFDYWQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERITL  
 SCRASQSVTTDLAWYQMPGQAPRLLIYDASTRATGFPARFSGSGTDFTLTISLQAE  
 DFAVYYCQHYKTWPLTFGGGTVKVEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP  
 SPLFPGPSKPFWVLLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGP  
 TRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDR  
 RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLST  
 ATKDITYDALHMQUALPPR (SEQ ID NO: 80)

Конструкция 11F11\_CD28T\_ДНК (сигнальная последовательность выделена

жирным шрифтом)

**ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCC**  
**GCACGCCCCG**CAGGTGCAGTTGCAGGAGAGCGGGCCAGGCCTGGTGAAGCCCAGCC  
AAACACTGAGCCTCACCTGTACTGTGTCCGGTGGTAGCATTTCAGCGGGCGTATT  
ATTGGACATGGATACGCCAACCCCTGGAAAAGGGTTGGAGTGGATTGGATACATC  
CATTATTCTGGGTCCACCTATAGTAACCCTTCTCTCAAGTCTCGCATTACTATTAGTT  
TGGATACCTCTAAGAATCAGTTTAGTCTGAAGCTGAACAGTGAACCGCCGCCGACA  
CCGCGGTCTACTACTGTGCTAGGCAGGAGGATTACGGGGGACTGTTTCGATTACTGGG  
GCCAGGGGACATTGGTCACCGTTTCAAGCGGGGGCGCGGATCTGGCGGAGGGGGA  
TCTGGAGCGGAGGCTCTGAGATCGTAATGACTCAGAGCCCAGCCACCCTGTCCGTC  
TCTCCCGCGAACGCATCACTCTGAGCTGTAGGGCATCACAGTCTGTTACCACAGAT  
CTGGCTTGGTATCAACAAATGCCTGGGCAGGCCCGCGACTGTTGATTATGACGCC  
TCTACGCGGGCCACAGGATTTCTGCCCGTTCTCCGGGTCTGGTCTGGCACCGAT  
TTTACCTTGACAATCAGTAGCTTGCAGGCAGAAGATTTTCGCTGTGTATTACTGCCAA  
CATTATAAGACATGGCCTTTGACATTCGGCGGGGGAACCAAAGTGGAGATCAAACG  
CGCCGAGCCCTGGACAATGAGAAGTCTAATGGGACCATATTCACGTCAAAGGGA  
AACACCTGTGCCCTCTCTCTGTTCACAGGCCCTTCTAAGCCCTTCTGGGTTCTCGT  
GGTGGTGGCGGTGTCTGGCCTGCTATTCCTTCTTGTGACAGTGGCCTTTATCATT  
TTTTGGGTGAGATCCAAAAGAAGCCGCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACT  
CCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGA  
TTTCGCTGCCTATCGGAGCCGAGTGAATTTTCTAGATCAGCTGATGCTCCCGCTA  
TCAGCAGGGACAGAATCAACTTTACAATGAGCTGAACCTGGGTCGCAGAGAAGAGT  
ACGACGTTTTGGACAAACGCCGGGCGGAGATCCTGAGATGGGGGGGAAGCCGAG  
AAGGAAGAATCCTCAAGAAGGCCTGTACAACGAGCTTCAAAAAGACAAAATGGCTG  
AGGCGTACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGACGAGGCAAGGGTCACGA  
TGGCTTGATCAGGGCCTGAGTACAGCCACAAAGGACACCTATGACGCCCTCCACAT  
GCAGGCACTGCCCCACGCTAG (SEQ ID NO: 81)

Конструкция 11F11\_CD28T\_AA (сигнальная последовательность выделена

жирным шрифтом)

**MALPVTALLPLALLHAARPVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGAYYWT**  
WIRQHPGKGLEWIGYIHYSYSTYNSPLKSRITISLDTSKNQFSLKLNsvTAADTAVYYC  
ARQEDYGGFLFDYWGQGLVTVVSSGGGGSGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERITL  
SCRASQSVTTDLAWYQMPGQAPRLLIYDASTRATGFPARFSGSGSGTDFTLTISSLQAE

DFAVYYCQHYKTWPLTFGGGTKVEIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSK  
 PFWVLVVVGGVVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPY  
 APPRDFAAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG  
 GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDA  
 LHMQUALPPR (SEQ ID NO: 82)

Конструкция 11F11 CD8 ДНК (сигнальная последовательность выделена  
 жирным шрифтом)

**ATGGCACTCCCCGTAAC**TGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCC  
**GCACGCCCGCAGGT**ACAGTTGCAGGAAAGCGGCCCGCCTTGTAACCAAGCC  
 AGACTCTCAGTTTACTTGCACCGTCTCAGGAGGAAGCATTCCAGTGGGGCTTATT  
 ATTGGACTTGGATTCCGGCAGCATCCTGGGAAAGGGTTGGAATGGATCGGTTATATTC  
 ATTATAGCGGTAGCACCTATTCCAATCCGTCTTTGAAAAGCAGAATCACTATTTAC  
 TCGACACCTCTAAGAACCAGTTCAGTCTCAAACCTGAACTCCGTGACAGCGGCCGAC  
 ACAGCTGTGTACTACTGTGCACGGCAAGAAGATTATGGGGGGCTGTTCGATTATTGG  
 GGCCAAGGCACACTGGTGACAGTATCAAGCGGTGGAGGAGGCTCCGGGGGCGGAG  
 GAAGTGGAGGCGGGGGGAGCGAAATTGTGATGACCCAGTCTCCAGCCACGCTGTCA  
 GTGTCTCCGGGAGAACGCATAACCCCTCTCTGCGGGCCAGTCAGTCCGTCACGACC  
 GATTTGGCTTGGTATCAACAGATGCCTGGGCAGCCCCCGCTTGTGTATCTATGAC  
 GCCTCCACCAGAGCAACTGGTTTCCCCGCCGTTTCCAGCGGATCTGGAAGCGGTACA  
 GATTTTACACTTACCATCTCATCATGTGCAAGCTGAGGATTTTCCCGTGTACTACTGCC  
 AGCACTACAAGACCTGGCCTTTGACGTTCCGGCGCGGAACAAAAGTGGAGATTA  
 AGAGCCGCTGCCCTCAGTAACTCAATCATGTACTTTAGTCACTTTGTGCCTGTGTTT  
 TGCCAGCAAAGCCAACAACCACACCAGCACCCGCCCTCCAACGCCTGCCCAACC  
 ATCGCCTCCAGCCTCTGAGCTTGAGGCTGAGGCTTGTCGCCAGCTGCTGGAGGT  
 GCTGTGCATACAGGACTGGATTTCCGCTGCGATATCTATATCTGGGCACCACTT  
 GCCGGTACTTGTGGTGTGTTGCTGCTCTCACTGGTCATCACGCTGTACTGTAACCATA  
 GGAATAGATCCAAAAGAAGCCGCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCA  
 CGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTT  
 GCTGCCTATCGGAGCCGAGTGAATTTTCTAGATCAGCTGATGCTCCCGCCTATCAG  
 CAGGGACAGAATCAACTTTACAATGAGCTGAACCTGGGTCGACAGAGAAGAGTACGA  
 CGTTTTGGACAAACGCCGGGGCCGAGATCCTGAGATGGGGGGGAAGCCGAGAAGG  
 AAGAATCCTCAAGAAGGCCTGTACAACGAGCTTCAAAAAGACAAAATGGCTGAGGC  
 GACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGACGAGGCAAGGGTCACGATGGCT

044866

TGTATCAGGCCTGAGTACAGCCACAAAGGACACCTATGACGCCCTCCACATGCAG  
GCACTGCCCCACGCTAG (SEQ ID NO: 83)

Конструкция 11F11 CD8 AA (сигнальная последовательность выделена  
жирным шрифтом)

**MALPVTALLPLALLHAARP**QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSSGSSISSGAYYWT  
WIRQHPGKGLEWIGYIHYSGSTYSNPSLKRITISLDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYC  
ARQEDYGGFLFDYWGGTLVTVSSGGGGGGGGGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERITL  
SCRASQSVTTDLAWYQQMPGQAPRLLIYDASTRATGFPARFSGSGSDFTLTISSLQAE  
DFAVYYCQHYKTWPLTFGGGTKVEIKRAAALNSIMYFSHFVVPVFLPAKPTTTPAPRPPT  
PARTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCN  
HRNRSKRSRLHSDYMNMPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQ  
QQQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEA  
YSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 84)

Человеческая FLT3 NM\_004119 AA

MPALARDGGQLPLLVVFSAMIFGTITNQDLPVIKCVLINHKNNDSVVGKSS  
SYPMVSEPEDLGCALRPQSSGTVYEA AAVEVDV SASITLQVLVDAPGNISCLWVFKHS  
SLNCQPHFDLQNRGVVSMVILKMTETQAGEYLLFIQSEATNYTILFTV SIRNTLLYTLRRP  
YFRKMENQDALVCISEVPEPIVEWVLCDSQGESCKEESPAVVKKEEKVLHELFGTDIRC  
CARNELGRECTRLFTIDLNQTPQTLPQLFLKVGEPWIRCKAVHVNHGFGTLWELENK  
ALEEGNYFEMSTYSTNRTMIRILFAFVSSVARNDTGYTCSSSKHPSQSALVTIVEKGFIN  
ATNSSEYDQYEEFCFSVRFKAYPQIRCTWTF SRKSFPCQKGLDNGYSISKFCNHKH  
QPGYIFHAENDDAQFTKMTLNIRRKQVLAEASASQASCFSDGYPLPSWTWKKCSDK  
SPNCTEEITEGVWNRKANRKVFGQWVSSSTLNMSEAIKGLVKCCAYNSLGTSCETILL  
NSPGPFPIQDNISFYATIGVCLLFIVVLTLLICHKYKQFRYESQLQMVQVTGSSDNEYF  
YVDFREYEDLKWEPRENLEFGKVLGSGAFGKVMNATAYGISKTGVSQVAVKMLKE  
KADSSEREALMSELKMMTQLGSHENIVNLLGACTLSGPIYLIFEYCCYGDLLNYLRSKR  
EKFHRTWTEIFKEHNFSFYPTFQSHPNSSMPGSREVQIHPDSQISGLHGNSFHSEDEIEY  
ENQKRLEEEEDLNVLTFEDLLCFAYQVAKGMEFLEFKSCVHRDLAARNVLVTHGKVVK  
ICDFGLARDIMSDSNVVRGNARLPVKWMAPELFEFEGYTIKSDVWVSYGILLWEIFSLGV  
NPYPGIPVDANFYKLIQNGFKMDQPFYATEEYIIMQSCWAFDSRKRPSFPNLTSLGQCQL  
ADAEAMYQNVDRVSECPHTYQNRPPSREMDLGLLSPQAQVEDS (SEQ ID NO: 85)

ДНК с сигнальным пептидом CAR

ATGGCACTCCCGTAACTGCTCTGCTGCTGCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCCGCA  
CGCCCG (SEQ ID NO: 86)

Сигнальный пептид CAR: MALPVTALLPLALLHAARP (SEQ ID NO:  
87)

scFv G4S-линкерная ДНК

GGCGGTGGAGGCTCCGGAGGGGGGGCTCTGGCGGAGGGGGCTCC (SEQ ID NO: 88)

scFv G4s линкер: GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 89)

Линкер scFv Whitlow ДНК

GGGTCTACATCCGGCTCCGGGAAGCCCGAAGTGCGGAAGGTAGTACAAAGGGG  
(SEQ ID NO: 90)

Линкер scFv Whitlow: GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 91)

4-1BB последовательность нуклеиновой кислоты (внутриклеточный домен)

AAGCGCGGCAGGAAGAAGCTCCTACATTTTAAGCAGCCTTTTATGAGGCCGTACAGACAAC  
ACAGGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCAGATTTCCCGAGGAGGAGGAAGGTGGGTGCGAGCTG  
(SEQ ID NO: 92)

4-1BB AA (внутриклеточный домен)

KRGRKLLYIFKQFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 93)

OX40 AA

RRDQRLPPDANKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI (SEQ ID NO: 94)

### Включение посредством ссылки

Все публикации, патенты и заявки на патент, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же мере, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были конкретно и отдельно указаны для включения посредством ссылки. Тем не менее, цитирование ссылки в данном документе не должно рассматриваться как подтверждение того, что такая ссылка является предыдущим уровнем техники для настоящего изобретения. В той степени, в которой любое из определений или терминов, представленных в ссылках, включенных посредством ссылки, отличается от условий и обсуждений, представленных в настоящем документе, настоящие правила и определения имеют преимущественную силу.

### Эквиваленты

Приведенное выше письменное описание считается достаточным для обеспечения осуществления на практике настоящего изобретения специалистом в данной области. Приведенное выше описание и примеры конкретизируют определенные предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения и описывают наилучший режим, рассмотренный авторами настоящего изобретения. Тем не менее, следует понимать, что независимо от того, как подробно изложено приведенное выше в тексте, настоящее изобретение может осуществляться на практике множеством способов, и настоящее изобретение следует толковать в соответствии с прилагаемой формулой изобретения и любыми ее эквивалентами.

Следующие примеры, в том числе проведенные эксперименты, достигнутые результаты представлены в исключительно в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения настоящего изобретения.

#### Пример 1.

Клетки Namalwa, MV4;11 и HL60 (ATCC) и клетки EoL1 (Sigma-Aldrich) культивировали в среде RPMI1640 (Lonza) + 10% FBS (Corning) + 1X пенициллин стрептомицин L-глутамин (Corning) (R10) и поддерживали при плотности клеток от  $0,5-2,0 \times 10^6$  клеток/мл. Для исследования экспрессии FLT3 поверхностью клеток клетки инкубировали с антителом к FLT3 (BD Pharmingen) или антителом к изотипическому контролю IgG1 (BD Pharmingen) в окрашенном буфере (BD Pharmingen) в течение 30 мин при 4°C. Затем клетки промывали и повторно суспендировали в окрашенном буфере с пропицидум йодидом (BD Pharmingen) перед накоплением данных. Экспрессия FLT3 на клетки-мишени показано на фиг. 1.

#### Пример 2.

Плазмиды, кодирующие промотор T7, конструкцию CAR и стабилизирующую бета-глобин последовательность линейаризовали путем ферментации 10 мкг ДНК с EcoRI и BamHI (NEB) в течение ночи. Затем ДНК ферментировали в течение 2 ч при 50°C с протеиназой K (Thermo Fisher, 600 ед./мл) очищали с помощью фенола/хлороформа и осаждали путем добавления ацетата натрия и двух объемов этанола. Затем пеллеты высушивали, повторно суспендировали в не содержащей РНКазы/ДНКазы воде и выражали количественно с использованием NanoDrop. Затем применяли один мкг линейной ДНК для транскрипции *in vitro* с использованием mMESSAGING mMACHINE T7 Ultra (Thermo Fisher), следуя инструкциям производителя. РНК дополнительно очищали с использованием набора MEGAClear (Thermo Fisher), следуя инструкциям производителя, и подсчитывали с помощью NanoDrop. Целостность mRNA оценивали с использованием подвижности на агарозного геля. РВМС выделяли из лейкопаков здорового донора (Nemasare) с использованием центрифугирования для повышения плотности фикола-пак согласно инструкциям производителя. РВМС стимулировали с использованием ОКТ3 (50 нг/мл, Miltenyi Biotec) в среде R10 + IL-2 (300 МЕ/мл, Proleukin®, Prometheus® Therapeutics and Diagnostics). Через 7 дней после стимуляции Т-клетки дважды промывали в среде Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) и повторно суспендировали при конечной концентрации  $2,5 \times 10^7$  клеток/мл в среде Opti-MEM. При электропорации применяли 10 мкг mRNA. Электропорацию клеток осуществляли с использованием системы Gemini X2 (Harvard Apparatus BVTX) для доставки единственного импульса 400 В в течение 0,5 мс в 2 мм кюветах (Harvard Apparatus BVTX). Клетки сразу же переносили в среду R10 + IL-2 и оставляли для восстановления в течение 6 ч. Для оценки экспрессии CAR Т-клетки окрашивали с помощью FLT3-HIS (Sino Biological Inc.) или биотинилированного белка L (Thermo Scientific) в окрашенном буфере (BD Pharmingen) в течение 30 мин при 4°C. Затем клетки промывали и окрашивали с помощью anti-HIS-PE (Miltenyi Biotec) или PE Streptavidin (BD Pharmingen) в окрашенном буфере в течение 30 мин при 4°C. Затем клетки промывали и повторно суспендировали в окрашенном буфере с помощью пропицидум йодида (BD Pharmingen) перед накоплением данных. Экспрессия FLT3 CAR в электропорированных Т-клетках показана на фиг. 2.

#### Пример 3.

Для оценки цитолитической активности в электропорированных FLT3 CAR Т-клетках эффекторные клетки культивировали с клетками-мишенями при соотношении Е:Т 1:1 в среде R10. Через 16 ч после совместного культивирования надосадочные жидкости анализировали посредством Luminex (EMD Millipore) и жизнеспособность клеток-мишеней оценивали посредством проточного цитометрического анализа поглощения пропицидум йодида (PI) CD3-отрицательными клетками. Цитолитическая активность электропорированных CAR Т-клеток показана на фиг. 3, а образование цитокинов показано на фиг. 4.

## Пример 4.

Вектор переноса лентивируса третьего поколения, содержащий различные конструкции CAR, применяли вместе с ViraPower Lentiviral Packaging Mix (Life Technologies) с образованием лентивирусных надосадочных жидкостей. Вкратце, преобразующая смесь было образована путем смешивания 15 мкг ДНК и 22,5 мкл полиэтиленimina (Polysciences, 1 мг/мл) в 600 мкл среды OptiMEM. Смесь инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Одновременно 293 Т-клеток (АТСС) трипсинизировали, подсчитывали и всего  $10 \times 10^6$  клеток высевали в сосуд Т75 вместе с преобразующей смесью. Через 3 дня после преобразования надосадочные жидкости собирали и фильтровали через 0,45 мкм фильтр, и хранили при  $-80^\circ\text{C}$  до применения. РВМС выделяли из лейкопаков здорового донора (Hemacare) с использованием центрифугирования для повышения плотности фиколл-пак согласно инструкциям производителя. РВМС стимулировали с использованием ОКТ3 (50 нг/мл, Miltenyi Biotec) в среде R10 + IL-2 (300 МЕ/мл, Proleukin®, Prometheus® Therapeutics and Diagnostics). Через 48 ч после стимуляции клетки трансфицировали с использованием лентивируса при MOI=10. Клетки выдерживали при  $0,5-2,0 \times 10^6$  клеток/мл перед применением анализов активности. Для оценки экспрессии CAR Т-клетки окрашивали с помощью FLT3-HIS (Sino Biological Inc.) или биотинилированного белка L (Thermo Scientific) в окрашенном буфере (BD Pharmingen) в течение 30 мин при  $4^\circ\text{C}$ . Затем клетки промывали и окрашивали с помощью anti-HIS-PE (Miltenyi Biotec) или PE Streptavidin (BD Pharmingen) в окрашенном буфере в течение 30 мин при  $4^\circ\text{C}$ . Затем клетки промывали и повторно суспендировали в окрашенном буфере с помощью пропидиум йодида (BD Pharmingen) перед накоплением данных. Экспрессия FLT3 CAR в Т-клетках от двух здоровых доноров показана на фиг. 5.

## Пример 5.

Для оценки цитолитической активности в трансфицированных лентивирусом FLT3 CAR Т-клетках эффекторные клетки культивировали с клетками-мишенями при соотношении Е:Т 1:1 в среде R10. Через 16 ч после совместного культивирования надосадочные жидкости анализировали посредством Luminox (EMD Millipore) и жизнеспособность клеток-мишеней оценивали посредством проточного цитометрического анализа поглощения пропидиум йодида (PI) CD3-отрицательными клетками. Средняя цитолитическая активность трансфицированных лентивирусом CAR Т-клеток от двух здоровых доноров показана на фиг. 6, и образование цитокинов посредством CAR Т-клеток от каждого здорового донора показано на фиг. 7.

## Пример 6.

Для оценки пролиферации CAR Т-клетки в ответ на экспрессирующие FLT3 клетки-мишени, Т-клетки отмечали с помощью CFSE перед совместным культивированием с клетками-мишенями в соотношении Е:Т 1:1 в среде R10. Через 5 дней пролиферацию Т-клеток оценивали посредством проточного цитометрического анализа разведения CFSE. Пролиферация FLT3 CAR Т-клеток показана на фиг. 8.

## Пример 7.

Для оценки активности против лейкоза *in vivo* FLT3 CAR Т-клетки генерировали для применения в ксеногенной модели АМЛ человека. Экспрессия CAR различных эффекторных линий, применяемая в ксеногенной модели АМЛ человека, показана на фиг. 9. Меченные люциферазой клетки MV4;11 ( $2 \times 10^6$ /животное) внутривенно вводили самкам мышей NSG 5-6-недельного возраста. Через 6 дней  $6 \times 10^6$  Т-клеток ( $\sim 50\%$  CAR<sup>+</sup>) в 200 мкл PBS вводили внутривенно и опухолевую нагрузку животных измеряли еженедельно с использованием биолюминесцентной визуализации. Как показано на фиг. 10, инъекция экспрессирующих 10E3-CD28Т и 8B5-CD28Т CAR Т-клеток значительно снижала опухолевую нагрузку во все оцениваемые моменты времени. Как показано на фиг. 11, это дополнительно подтверждалось анализом выживаемости, когда инъекция экспрессирующих 10E3-CD28Т или 8B5-CD28Т CAR Т-клеток обеспечивала значительное преимущество выживаемости среди животных, которые получали преобразованные с помощью Mock клетки или CAR Т-клетки, экспрессирующие конструкции 10E3-CD28Т или 10E3-CD8. Значительных отличий между конструкциями 10E3-CD28Т и 8B5-CD28Т с точки зрения эффективности не наблюдали.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Химерный антигенный рецептор, который специфично связывается с FLT3, причем химерный антигенный рецептор включает антигенсвязывающую молекулу, которая специфично связывается с FLT3, костимулирующий домен и активирующий домен, представляющий собой сигнальный домен CD3 дзета, при этом антигенсвязывающая молекула содержит

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность области ("CDR") 1, 2 и 3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 19 соответственно, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR 1, 2 и 3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24 соответственно; или

область VH с последовательностью SEQ ID NO: 16 и область VL с последовательностью SEQ ID NO: 21;

где области VH и VL связаны посредством по меньшей мере одного линкера, где линкер представляет собой линкер scFv G4S или линкер scFv Whitlow.

2. Химерный антигенный рецептор по п.1, где костимулирующий домен представляет собой сигнальную область CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, Programmed Death-1 (PD-1), индуцируемый костимулятор Т-клеток (ICOS), связанный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1, CD1-1a/CD18), CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig альфа (CD79a), DAP-10, Fc гамма рецептор, молекулу МНС класса I, TNF рецепторные белки, белок иммуноглобулин, рецептор к цитокинам, интегрин, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM), активирующие рецепторы NK-клеток, BTLA, рецептор к Толл-лигандам, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8 альфа, CD8 бета, IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDI 1d, ITGAE, CD103, ITGAL, CDI 1a, LFA-1, ITGAM, CDI 1b, ITGAX, CDI 1c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a или лиганд, который специфично связывается с CD83.

3. Химерный антигенный рецептор по п.2, где костимулирующий домен CD28 включает последовательность, которая отличается не более чем на 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотный остаток от последовательности в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 4 в комбинации с SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 8, или костимулирующий домен CD8 включает последовательность, которая отличается не более чем на 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотный остаток от последовательности в SEQ ID NO: 14.

4. Химерный антигенный рецептор по п.2, где CD3 дзета включает последовательность, которая отличается не более чем на 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотный остаток от последовательности в SEQ ID NO: 10.

5. Химерный антигенный рецептор по любому из пп.1-4, где костимулирующий домен включает последовательность, которая отличается не более чем на 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотный остаток от последовательности в SEQ ID NO: 2, и активирующий домен включает последовательность, которая отличается не более чем на 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотный остаток от последовательности в SEQ ID NO: 10.

6. Полинуклеотид, кодирующий химерный антигенный рецептор по любому из пп.1-5.

7. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по п.6, причем вектор экспрессии представляет собой ретровирусный вектор, вектор ДНК, плазмиду, вектор РНК, аденовирусный вектор, связанный с аденовирусом вектор или лентивирусный вектор.

8. Иммунная клетка, экспрессирующая химерный антигенный рецептор, который специфично связывается с FLT3, содержащая вектор экспрессии по п.7.

9. Иммунная клетка по п.8, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку, проникающий в опухоль лимфоцит (TIL), NK-клетку, TCR-экспрессирующую клетку, дендритную клетку или NK-Т-клетку.

10. Иммунная клетка по п.9, где клетка представляет собой аутологичную Т-клетку.

11. Иммунная клетка по п.9, где клетка представляет собой аллогенную Т-клетку.

12. Иммунная клетка по п.8, где вектор экспрессии введен в клетку, которая выделена из организма пациента или организма донора или которая выращена из образца, взятого из организма пациента или организма донора.

13. Фармацевтическая композиция, содержащая иммунную клетку по любому из пп.8-12.

14. Способ лечения связанного с FLT3 заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту химерного антигенного рецептора по любому из пп.1-5, или введение субъекту клетки по любому из пп.8-12, или введение субъекту фармацевтической композиции по п.13.

15. Способ по п.14, где заболевание или нарушение представляет собой рак.

16. Способ по п.15, где рак представляет собой лейкоз, лимфому или миелому.

17. Способ по п.14, где заболевание или нарушение представляет собой по меньшей мере одно из следующего: острый миелоидный лейкоз (AML), хронический миелогенный лейкоз (CMML), хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML), ювенильный миеломоноцитарный лейкоз, атипичный хронический миелоидный лейкоз, острый промиелоцитный лейкоз (APL), острый монобластный лейкоз, острый эритроидный лейкоз, острый мегакариобластный лейкоз, миелодиспластический синдром (MDS), миелопролиферативное нарушение, миелоидное новообразование, миелоидная саркома и воспалительное/аутоиммунное заболевание.

18. Способ по п.17, где воспалительное/аутоиммунное заболевание представляет собой по меньшей мере одно из следующего: ревматоидный артрит, псориаз, виды аллергии, астма, болезнь Крона, IBD (воспалительное заболевание кишечника), IBS (синдром раздражённого кишечника), фибромиалгия, мастоцитоз и глютенная энтеропатия.

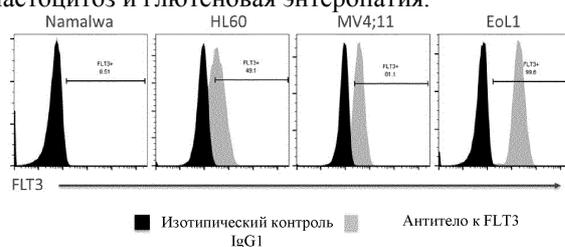
19. Применение химерного антигенного рецептора по любому из пп.1-5 для лечения связанного с FLT3 заболевания или нарушения.

20. Применение по п.19, где заболевание или нарушение представляет собой рак.

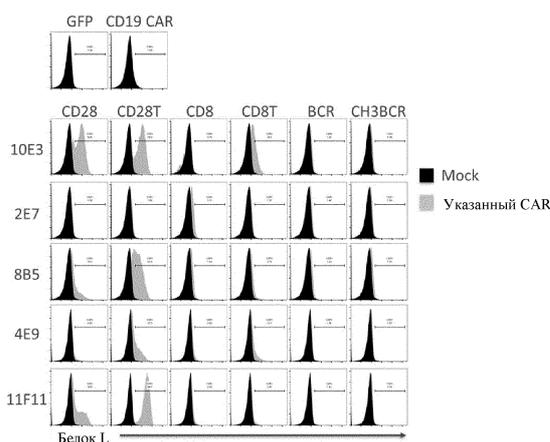
21. Применение по п.20, где рак представляет собой лейкоз, лимфому или миелому.

22. Применение по п.19, где заболевание или нарушение представляет собой по меньшей мере одно из следующего: острый миелоидный лейкоз (AML), хронический миелогенный лейкоз (CML), хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML), ювенильный миеломоноцитарный лейкоз, атипичный хронический миелоидный лейкоз, острый промиелоцитный лейкоз (APL), острый монобластный лейкоз, острый эритроидный лейкоз, острый мегакариобластный лейкоз, миелодиспластический синдром (MDS), миелопролиферативное нарушение, миелоидное новообразование, миелоидная саркома и воспалительное/аутоиммунное заболевание.

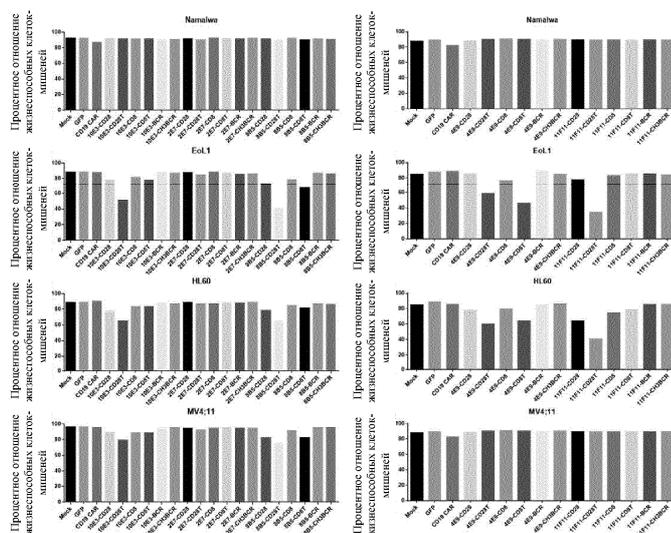
23. Применение по п.22, где воспалительное/аутоиммунное заболевание представляет собой по меньшей мере одно из следующего: ревматоидный артрит, псориаз, виды аллергии, астма, болезнь Крона, IBD, IBS, фибромиалгия, мастоцитоз и глютеновая энтеропатия.



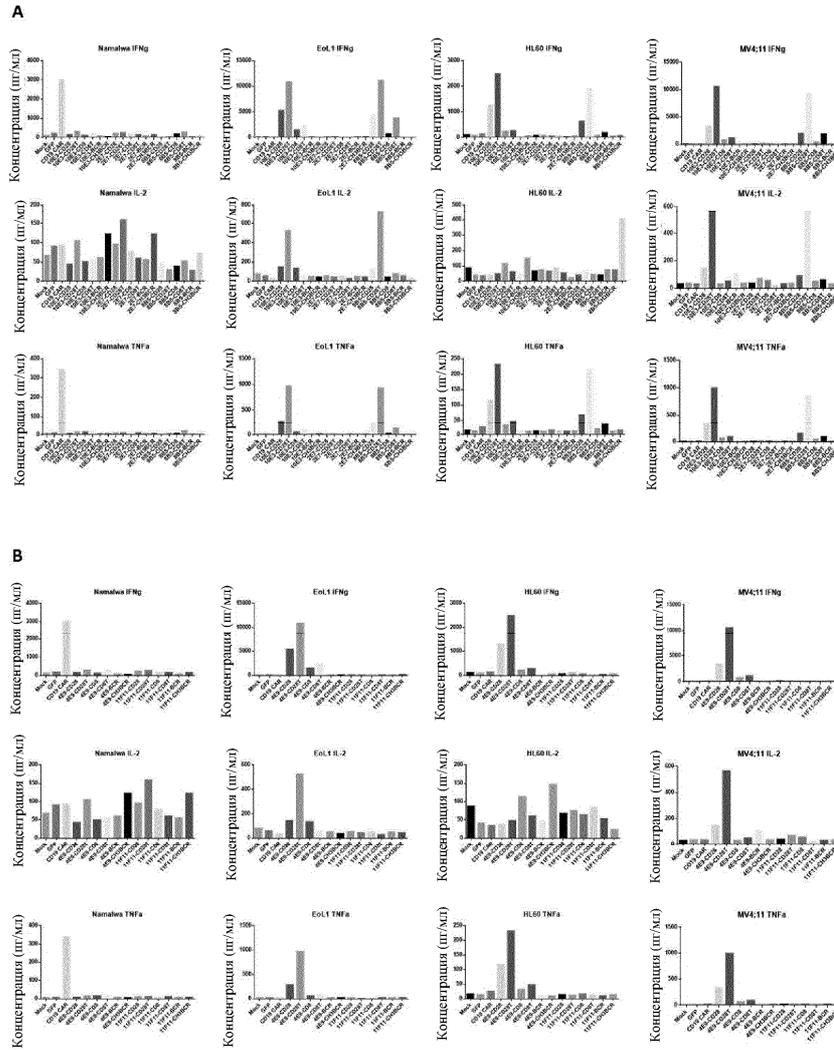
Фиг. 1



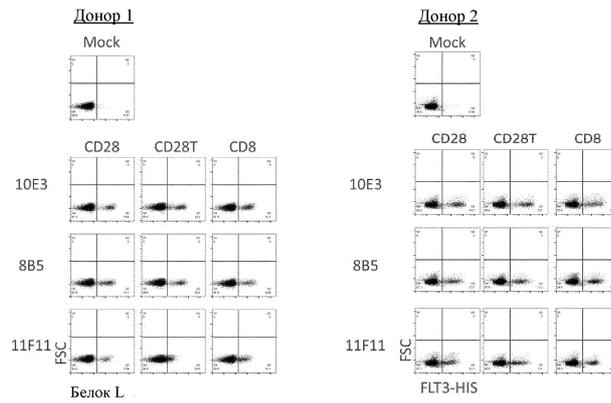
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



