

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391764 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.01.31

(22) Дата подачи заявки
2017.03.31

(51) Int. Cl. C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 5/078 (2010.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) ХИМЕРНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ К FLT3 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/317,219

(32) 2016.04.01

(33) US

(62) 201892193; 2017.03.31

(71) Заявитель:
АМГЕН ИНК.; КАЙТ ФАРМА, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:

Бэккер Элис, Ву Лорен, Арведсон
Тара, Вилтзиус Джек Дж., Родригез
Рубен Альварез (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В соответствии с настоящим 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.

A1

202391764

202391764

A1

ХИМЕРНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ К FLT3 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0001] 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.

[0002] 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.

[0003] 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).

[0004] При связывании с лигандом FLT3 рецептор FLT3 подвергается гомогенизации, обеспечивая таким образом аутофосфорилирование специфичных остатков тирозина в околочелюстном 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.

[0005] Человеческий FLT3 экспрессируется в CD34⁺CD38⁻ 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⁺CD38⁺CD45RA⁻CD123^{low}, клеток предшественников гранулоцитов и моноцитов (GMP) CD34⁺CD38⁺CD45RA⁺CD123^{low}, и общих лимфоидных клеток-предшественников (CLP) CD34⁺CD38⁺CD10⁺CD19⁻. Примечательно, что экспрессия FLT3 практически отсутствует в CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD123⁻ 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.

[0006] 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 I836, 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.

[0007] 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 сигнализирующие маршруты, связанные с любой мутацией, отличаются, прежде всего, тем, что предпочтительная активация STAT5 посредством FLT3-ITD, что приводит, таким образом, к повышению потенциала пролиферации и неправильной регуляции маршрутов восстановления ДНК.

[0008] Независимо от статуса мутации FLT3, фосфорилирование FLT3 проявляется у более чем двух третей 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.

[0009] 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.

[0010] Несколько ранних FLT3 TKI помимо прочих включали мидостаурин (PKC412), лестауртиниб (CEP-701), сунитиниб (SUI1248) 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.

[0011] 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 ингибиторов киназы Auroga, в том числе AMG 900 и ингибиторов для Polo-подобных киназ, которые играют важную роль в прогрессировании клеточного цикла.

[0012] 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.

[0013] 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 адоптивной иммунотерапии.

[0014] 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 сигнализирующими молекулами, и/или одного или нескольких активирующих доменов, например, CD3 дзета.

[0015] Помимо способности CAR-T-клеток распознавать и разрушать клетки-мишени, успешная Т-клеточная терапия повышает способность CAR-T-клеток сохраняться и поддерживать способность к пролиферации в ответ на антиген.

[0016] 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 (α) и бета (β) цепи. Примерно в 5% человеческих Т-клеток TCR состоит из гамма и дельта (γ/δ) цепей. каждая цепь составлена из двух внеклеточных доменов: вариабельной области (V) и постоянной области (C), обе из надсемейства иммуноглобулинов. Как и в других иммуноглобулинах, каждый из вариабельных доменов α -цепи и β -цепи TCR (или гамма и дельта (γ/δ) цепи) имеют три гипервариабельные 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.

[0017] 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

[0018] 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.

[0019] Настоящее изобретение также относится к новой последовательности CD28, пригодной в качестве костимулирующих доменов в данных клетках.

[0020] 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.

[0021] 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) вариабельная 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) вариабельная 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) вариабельная область CDR3 тяжелой цепи, содержащая аминокислотную последовательность которая отличается от последовательности в SEQ ID NO SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO:27 не более чем на 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков; (d) вариабельная 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) вариабельная 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) вариабельная область CDR3 легкой цепи, содержащая аминокислотную последовательность которая отличается от последовательности в SEQ ID:24 или SEQ ID NO:32 не более чем на 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков.

[0022] 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.

[0023] 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, 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 MHC класса 1, 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, 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, Lyl08), 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.

[0024] В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен получен из 4-1BB. В других вариантах осуществления костимулирующий домен получен из OX40. См. также Hombach *et al.*, *Oncoimmunology*. 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.

[0025] 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.

[0026] 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.

[0027] 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.

[0028] 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.

[0029] 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.

[0030] В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающие молекулы (и химерные антигенные рецепторы, содержащие данные молекулы), где линкер содержит по меньшей мере один из линкера scFv G4S и линкера scFv Whitlow.

[0031] 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), НК-клетки, TCR-экспрессирующие клетки, дендритные клетки или НК-Т-клетки. Т-клетки могут быть аутологическими, аллогенными или гетерологичными.

[0032] 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 переменную область CDR3 тяжелой цепи (V_H), 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.

[0033] 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, CD 33, 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-Н3), LIGHT (член надсемейства факторов некроза опухоли 14; TNFSF14), NKG2C, Ig альфа (CD79a), DAP-10, Fc гамма рецептор, молекула MHC класса I, TNF, TNF γ , интегрин, сигнальная молекула активации лимфоцитов, BTLA, рецептор к Толл-лигандам, ICAM-1, B7-Н3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8 α , CD8 β , 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.

[0034] 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_L), 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.

[0035] 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).

[0036] 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).

[0037] 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.

[0038] Дополнительные переменные 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 года.

[0039] 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 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) 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

[0040] На фиг. 1 показана проточная цитометрия экспрессии поверхности клеток FLT3 на человеческих клеточных линиях.

[0041] На фиг. 2 показана экспрессия CAR в первичных человеческих Т-клетках, электропорированных с mRNA, кодирующая различные CAR.

[0042] На фиг. 3 показана цитолитическая активности электропорированных Т-клеток CAR в сравнении с несколькими клеточными линиями после 16 часов совместного культивирования.

[0043] На фиг. 4, включающей фиг. 3А и 3В, показано получение $IFN\gamma$, IL-2, и $TNF\alpha$ посредством электропорированных Т-клеток CAR после 16 часов совместного культивирования с указанными целевыми клеточными линиями.

[0044] На фиг. 5 показана экспрессия CAR в трансфицированных лентивирусом первичных человеческих Т-клетках от двух здоровых доноров.

[0045] На фиг. 6 показана средняя цитолитическая активность с течением времени от двух здоровых доноров, экспрессирующих указанные CAR, совместно культивированные с различными целевыми клеточными линиями.

[0046] 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 часов совместного культивирования с указанными целевыми клеточными линиями.

[0047] 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.

[0048] На фиг. 9 показана экспрессия CAR в трансфицированных лентивирусом первичных человеческих Т-клетках, пригодных для исследований *in vivo*.

[0049] На фиг. 10 показана биолюминесцентная визуализация меченных клеток острого миелоидного лейкоза после внутривенной инъекции Т-клеток CAR в ксеногенной модели.

[0050] На фиг. 11 показаны кривые выживаемости мышей, которым инъецировали Т-клетки CAR.

[0051] На фиг. 12 показана векторная диаграмма pGAR.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0052] 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.

[0053] 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 переменные 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.

[0054] **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.

[0055] Определенные домены CD28 применялись в химерных антигенных рецепторах. В соответствии с настоящим изобретением, в настоящее время было обнаружено, что новый внеклеточный домен CD28, называемый «CD28Т», неожиданно обеспечивает определенные преимущества при использовании в конструкции CAR.

[0056] Нуклеотидная последовательность молекулы CD28Т, в том числе внеклеточный домен CD28Т, и трансмембранный и внутриклеточный домены CD28 перечислены в SEQ ID NO: 1:

[0057]

СТТГАТААТГААААГТCAAACGGAACAАТCАТТCАCGTGAAGGGCAAGCACCTCTG
TCCGTCACCCTTGTTCCCTGGTCCATCCAAGCCATTCTGGGTGTTGGTCGTAGTGGGT
GGAGTCCTCGCTTGTTACTCTCTGCTCGTCACCGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTТА
GATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGC
CCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCC
TATCGGAGC

[0058] Соответствующая аминокислотная последовательность перечислена в SEQ ID NO: 2:

[0059]

LDNEKSNGTIHVKGKHLCP SPLFPGPSKPFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSK
RSRL LHSDYM NMPRRPGPT RKHYQPYAPP RDFAA YRS

[0060] Нуклеотидная последовательность внеклеточной части CD28Т перечислен в SEQ ID NO: 3:

[0061]

СТТГАТААТГААААГТCAAACGGAACAАТCАТТCАCGTGAAGGGCAAGCACCTCTG
TCCGTCACCCTTGTTCCCTGGTCCATCCAAGCCA

[0062] Соответствующая аминокислотная последовательность внеклеточного домена CD28Т перечислена SEQ ID NO: 4: LDNEKSNGTI HVKGKHLCP SPLFPGPSKPF

[0063] Нуклеотидная последовательность трансмембранного домена CD28 перечислена в SEQ ID NO: 5:

[0064]

TTCTGGGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGAGTCCTCGCTTGTTACTCTCTGCTCGTCACCG
TGGCTTTTATAATCTTCTGGGTT

[0065] Аминокислотная последовательность трансмембранного домена CD28 перечислена в

[0066] SEQ ID NO: 6: FWVLVVVGGV LACYSLLVTV AFIFWV

[0067] Нуклеотидная последовательность внутриклеточного сигнализирующего домена CD28 перечислена в SEQ ID NO: 7:

[0068]

AGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCG
CCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTGCTGC
STATCGGAGC

[0069] Аминокислотная последовательность внутриклеточного сигнализирующего домена CD28 перечислена в SEQ ID NO: 8:
RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS

[0070] Дополнительные последовательности CD28, пригодные для применения в настоящем изобретении, включают нуклеотидную последовательность CD28, перечисленную в SEQ ID NO: 11:

[0071]

ATTGAGGTGATGTATCCACCGCCTTACCTGGATAACGAAAAGAGTAACGGTACCAT
CATTACGTGAAAGGTAAACACCTGTGTCCTTCTCCCCTTCCCCGGGCCATCAAA
GCCC

[0072] Соответствующая аминокислотная последовательность перечислена в SEQ ID NO: 12:

[0073] IEVMYPPPYLDNEKSNGTPIHVKGKHLCPSPFPGPSKP

[0074] 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:

[0075]

GCTGCAGCATTGAGCAACTCAATAATGTATTTTAGTCACTTTGTACCAGTGTTCTTGC
CGGCTAAGCCTACTACCACACCCGCTCCACGGCCACCTACCCCAGTCCTACCATCG
CTTCACAGCCTCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCTTGCCGACCGGCCGCAGGGGGCGCTG
TTCATAACCAGAGGACTGGATTTGCGCTGCGATATCTATATCTGGGCACCCCTGGCCG
GAACCTGCGGCGTACTCCTGCTGTCCCTGGTCATCACGCTCTATTGTAATCACAGGA
AC

[0076] Соответствующая аминокислотная последовательность перечислена в SEQ ID NO: 14:

[0077]

AAALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR
GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN

[0078] 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, CD 33, 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 МНС класса I, TNF, TNF γ , 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, CD8альфа, CD8beta, 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.

[0079] **Активирующие домены.**

[0080] 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:

[0081]

```
AGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCA
ACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGC
GCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCCCGAGGA
GGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAG
GCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTTGTACCAGGGACT
CAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAG
G
```

[0082] Соответствующая аминокислота внутриклеточного CD3 дзета перечислена в SEQ ID NO: 10:

[0083]

```
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPR
RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM
QALPPR
```

ОРИЕНТАЦИЯ ДОМЕНА

[0084] 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.

[0085] 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.

[0086] Иллюстративные конструкции CAR в соответствии с настоящим изобретением перечислены в таблице 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

[0087] 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 эпсилон, 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.

[0088] **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 (*m.e.*, 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-la/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 NK-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, Lyl08), 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.

[0089] 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.

[0090] **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, CD11a/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 NK-клеток, BTLA, рецептора к Толл-лигандам, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFR, 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.

[0091] Необязательно, короткие линкеры могут образовывать связи между любыми или некоторыми внеклеточными, трансмембранным и внутриклеточными доменами CAR.

[0092] В одном варианте осуществления трансмембранный домен в CAR по настоящему изобретению представляет собой трансмембранный домен CD8. В одном 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, содержащуюся в SEQ ID NO: 14.

[0093] 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.

[0094] **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.

[0095] 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-la/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 NK-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.

[0096] 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.

[0097] Цитоплазматические сигнализирующие последовательности в цитоплазматической сигнализирующей части CAR по настоящему изобретению могут быть связаны между собой в случайном или определенном порядке.

[0098] 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.

[0099] 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.

[0100] 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.

[0101] 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 аденоассоциированного вируса (AAV), векторы вируса герпеса и вектор вируса осповакцины. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержится внутри плазмиды.

[0102] 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 лейкемии мышей, вектор SFG, плазмид, вектор РНК, аденовирусный вектор, бакуловирусный вектор, вектор вируса Эпштейна-Барр, вектор паповавируса, вектор вируса осповакцины, вектор вируса простого герпеса, вектор аденоассоциированного вируса (AAV), лентивирусный вектор (например, pGAR) или любые их комбинации. Карта вектора pGAR показана на фиг. 12. Последовательность pGAR является следующей:

```

CTGACGCGCCCTGTAGCGGGCGCATTAAGCGCGGGCGGGTGTGGTGGTTACGCG
CAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTCCCT
TCCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTT
TAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTG
ATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGG
AGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCSTA
TCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTAAA
AAATGAGCTGATTTAACA AAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGCTTAC
AATTTGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGC
CTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTG

```

GGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGT
AATACGACTCACTATAGGGCGACCCGGGGATGGCGCGCCAGTAATCAATTACGGGG
TCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTACATAACTTACGGTAAATGGC
CCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTT
CCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGG
TAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATT
GACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGG
GACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGCTGATGC
GGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAA
GTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGGTGGCACCAAAATCAACGGGACT
TTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTAC
GGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGGGTCTCTCTGGTTAGA
CCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCA
ATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGT
AACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCC
CGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGAC
TCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGC
CAAAAATTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGT
ATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGG
GAAAGAAAAATATAAATTAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACG
ATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGG
GACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAAT
ACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGA
AGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGACCACCGCACAGCAA
GCCGCCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTG
AATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAG
GCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGT
TCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTG
ACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCT
GAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGC
AGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTG
GGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACCTATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGAATGCT
AGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTGGATGGAGTG
GGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACTCCTTAATTGAAGAATCGC
AAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAG
TTTGTGGAATTGGTTAACATAACAAATTGGCTGTGGTATATAAAATTATTCATAAT
GATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAGAATAGTTTTTGCTGTACTTTCTATAGTGAA
TAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGAG
GGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGA
CAGATCCATTCGATTAGTGAACGGATCTCGACGGTATCGGTAACTTTTAAAAGAAA

AGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACA
GACATACAAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAATTTCAAATTTTATCGCG
ATCGCGGAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCA
TTTTGCAAGGCATGGAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTTA
GGAACAGAGAGACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCC
TGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCA
GTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAAATGACCCT
GTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTCTGC
TCCCCGAGCTCAATAAAAAGAGCCCACAACCCTCACTCGGCGCGCCAGTCCTTCGAA
GTAGATCTTTGTCGATCCTACCATCCACTCGACACACCCGCCAGCGGCCGCTGCCAA
GCTTCCGAGCTCTCGAATTAATTCACGGTACCCACCATGGCCTAGGGAGACTAGTCG
AATCGATATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAAC
TATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTA
TTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCT
TATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGT
GACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCGGGACT
TTCGCTTTCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACCTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCT
GCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCGTGGTGTGTCGGGGAAG
CTGACGTCCTTTTCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGT
CCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCTTCCCGCGGCCTGCT
GCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCC
CTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTGGTTAATTAAGTACCTTTAAGACCAATGACTTACA
AGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCGA
ATTCACTCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAG
ACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTC
AATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTG
GTAAGTACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGGCATG
CCAGACATGATAAGATAACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTG
AAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATA
AGCTGCAATAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAG
GGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTGGCGCGCCATCGTCGAGGTTCCCTTTAGTGAGGGT
TAATTGCGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCCTGTGTGAAATTGTTATCC
GCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTG
CCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCTTTCCAGT
CGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGC
GGTTTTCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCG
TTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACA
GAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCA
GGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACG
AGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAA

AGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTG
 CCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATA
 GCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTG
 TGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTG
 AGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGG
 ATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAA
 CTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTAC
 CTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCG
 GTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAA
 GATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTAA
 GGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA
 AAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTAC
 CAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAG
 TTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCC
 CCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAA
 TAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCC
 TCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAAT
 AGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTT
 GGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCC
 ATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAG
 TTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCA
 TGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAG
 AATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCG
 CGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGA
 AAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCA
 CCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACA
 GGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATAC
 TCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAG
 CGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTCCGCGCACATT
 TCCCCGAAAAGTGCCAC (SEQ ID NO: 95)

[0103] Дополнительные пригодные иллюстративные 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, TtRMPVIR, pMSCV-IRES-mCherry FP, pRetroX GFP T2A Cre, pRXTN, pLncEXP, и pLXIN-Luc.

[0104] В некоторых вариантах осуществления разработанная иммунная клетка представляет собой Т-клетку, проникающий в опухоль лимфоцит (TIL), НК-клетку, TCR-экспрессирующую клетку, дендритную клетку или НК-Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления клетку получают или изготавливают из периферической крови. В некоторых вариантах осуществления клетку получают или изготавливают из

моноклеарных 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.

[0105] 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 содержать (i) антигенсвязывающую молекулу (например, scFv), (ii) трансмембранную область и (iii) T-клеточную активирующую молекулу или область.

Антигенсвязывающие молекулы

[0106] Антигенсвязывающие молекулы входят в объем настоящего изобретения.

[0107] 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 (*m.e.*, Fc конденсированные молекулы, содержащие связывающиеся с пептидами домены) представляют собой другие примеры пригодных антигенсвязывающих молекул.

[0108] 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 переменный фрагмент с единственной цепью (scFv).

[0109] 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.

[0110] Иммунологически функциональные фрагменты включают без ограничения фрагменты scFv, фрагменты Fab (Fab', F(ab')₂ и т.п.), одна или несколько CDR, диатела (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, верблюжьих или кролика. Как будет понятно специалисту в данной области, антигенсвязывающая молекула может включать компоненты, не являющиеся белковыми.

[0111] 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.

[0112] 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.

[0113] 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 вариантах осуществления кодирующие гены белковые средства и/или антигенсвязывающая молекула для FLT3 могут быть в отдельных векторах.

[0114] 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.

[0115] 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.

[0116] 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.

[0117] Антигенсвязывающая молекула будет дополнительно понятна с учетом определений и описаний ниже.

[0118] 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.

[0119] «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')₂. «Фрагмент F(ab')₂» 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')₂, составленный, таким образом, из двух фрагментов Fab', которые удерживаются вместе посредством дисульфидной связи между двумя тяжелыми цепями.

[0120] «Область Fv» содержит переменные области как из тяжелой, так и из легкой цепей, но не содержит постоянных областей.

[0121] «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 РСТ WO88/01649 и Патенты США №№ 4946778 и 5260203, раскрытия которых включены посредством ссылки во всей своей полноте.

[0122] «Двухвалентная антигенсвязывающая молекула» содержит две антигенсвязывающие области. В некоторых 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.

[0123] 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 одном 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 $1,0-5 \times 10^{-10}$.

[0124] Как сообщается, антигенсвязывающая молекула является «селективной», если она связывается с одной мишенью более прочно, чем она связывается со второй мишенью.

[0125] 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.

[0126] 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 определениям 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.

[0127] 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 амино-конец полипептида. Легкие цепи включают каппа-цепи и лямбда-цепи.

[0128] 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 амино-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.

[0129] Термин «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к части легкой и/или тяжелой цепей антитела, обычно включая примерно амино-конец от 120 до 130 аминокислот в тяжелой цепи и приблизительно от 100 до 110 аминоконцевых аминокислот в легкой цепи. Вариабельная область антитела обычно определяет специфичность конкретного антитела в отношении его мишени.

[0130] Вариабельность не распределяется равномерно по всем вариабельным доменам антител; она сосредоточена в поддоменах каждой из вариабельных областей тяжелой и легкой цепей. Такие поддомены называются «гипервариабельными областями» или «определяющими комплементарность областями» (CDR). Более консервативные (т.е. негипервариабельные) части вариабельных доменов называются «каркасными» областями (FRM или FR) и обеспечивают каркас для образования антигенсвязывающей поверхности из шести CDR в трехмерном пространстве. Вариабельные домены встречающихся в природе тяжелых и легких цепей содержат четыре FRM-области (FR1, FR2, FR3 и FR4), в основном используя конфигурацию β -листа, соединенную тремя гипервариабельными областями, которые образуют петли, соединяющие структуру β -листа, а в некоторых случаях образующие часть его структуры. Гипервариабельные области в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости от FRM и вместе с гипервариабельными областями другой цепи способствуют образованию антигенсвязывающего сайта (см. Kabat с соавт., *loc. cit.*).

[0131] Термин «CDR» в единственном и множественном числе относится к определяющей комплементарности области. Три такие области придают связывающий характер вариабельной области легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3), а еще три придают связывающий характер вариабельной области тяжелой цепи (CDRH1, 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.

[0132] 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 «гипервариабельные области» в вариабельных 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 вариабельности 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.

[0133] 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 вариабельность 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.

[0134] 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 вариабельного 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.

[0135] 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.

[0136] 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.

[0137] 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.

[0138] 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 не прямой радиоиммунологический анализ твердой фазы (RIA), прямой или не прямой 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.

[0139] 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.

[0140] 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

[0141] 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).

[0142] 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.

[0143] 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.

[0144] 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.

[0145] 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, атипический 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..

[0146] Следует понимать, что целевые дозы для CAR⁺/ CAR-T⁺/ TCR⁺-клеток могут варьировать в диапазоне 1×10^6 - 2×10^{10} клеток/кг, предпочтительно 2×10^6 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.

[0147] 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.

[0148] 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*.

[0149] 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/м²/сут. до 2000 мг/м²/сут.) и определенных доз флударабина (от 20 мг/м²/сут. до 900 мг/м²/сут.). Предпочтительная схема дозирования включает

лечение пациента, предусматривающее ежедневное введение пациенту приблизительно 500 мг/м²/сут. циклофосфида и приблизительно 60 мг/м²/сут. флударабина в течение трех дней перед введением пациенту терапевтически эффективного количества разработанных Т-клеток.

[0150] 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.

[0151] В некоторых вариантах осуществления композиции, содержащие CAR-экспрессирующие иммунные эффекторныe клетки, раскрытые в данном документе, можно вводить вместе с любым числом химиотерапевтических средств. Примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклофосфамид (CYTOXANTM); 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, потфирамицин, пурамицин, 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, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидеоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин, 5-FU; андрогены, такие как калустерон, пропионат дромостанолонa, эпителиостанол, мепителиостан, тестолактон; средства, подавляющие функции надпочечников, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; компенсатор фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамид гликозид; аминоклевулиновая кислота; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; 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; тенуазоно́вая кислота; триазиквон; 2,2',2"-

трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ara-C»); циклофосфамид; тиотепа; таксаны, например, паклитаксел (TAXOL™, Bristol-Myers Squibb) и дексетаксел (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer); 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; аминоптерин; кселода; ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS2000; дифторметилорнитин (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 относительно 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 гoserелин; 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®), доксорубицин (гидроксидоксорбицин), винкристин (Онковин®) и преднизон.

[0152] 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.

[0153] 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.

[0154] Дополнительные терапевтические средства, пригодные для применения в комбинации с настоящим изобретением, включают без ограничения ибрутиниб (Imbruvica®), офатумумаб (Arzerra®), ритуксимаб (Rituxan®), бевацизумаб (Avastin®), трастузумаб (Herceptin®), трастузумаб эмастатин (KADCYLA®), иматиниб (Gleevec®),

цетуксимаб (Erbitux[®]), панитумумаб (Vectibix[®]), катумаксомаб, ибритумомаб, офатумумаб, тозитумомаб, брентуксимаб, алемтузумаб, гемтузумаб, эрлотиниб, gefitinib, 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).

[0155] 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 сиалилаты. 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.

[0156] 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; тромбозептин (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.

[0157] 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

[0158] Для получения полинуклеотидов может использоваться множество методик, полипептидов, векторов, антигенсвязывающих молекул, иммунных клеток, композиций и т.п. по настоящему изобретению.

[0159] 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 (РВМС), 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.

[0160] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки выделяют из РВМС посредством разрушения эритроцитов и снижения функции моноцитов, например, с использованием центрифугированием через градиент PERCOLL™. Конкретная субпопуляция Т-клеток, например, CD28⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺, и CD45RO⁺-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 иммуноадгезии или проточной цитометрии, в которых применяют смесь моноклональных антител, направленных на маркеры поверхности клетки, присутствующие на отрицательно выбранных клетках. Например, для обогащения клеток CD4⁺ 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.

[0161] РВМС 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 РВМС 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.

[0162] В некоторых вариантах осуществления клетки CD8⁺ дополнительно рассортированы на первичные, центральные запоминающие и эффекторные клетки посредством идентификации антигенов клеточной поверхности, которые связаны с каждым из данных типов клеток CD8⁺. 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⁺, CD62L⁺, CD8⁺-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 $CD4^+$ -Т-клетки дополнительно рассортированы на субпопуляции. Например, хелперные $CD4^+$ -Т-клетки могут быть рассортированы на первичные, центральные запоминающие и эффекторные клетки посредством идентификации популяций клеток, которые имеют антигены клеточной поверхности.

[0163] 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 WO2012/079000, 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.

[0164] 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 WO2012129514, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0165] 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.

[0166] 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.

[0167] 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 векторы 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.

[0168] 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 эубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные бактерии организмы, например, Enterobacteriaceae, 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.

[0169] 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 фосфата кальция, опосредованная катионными липидами доставка, опосредованная липосомами трансфекция, электропорация, бомбардировка микрочастицами, рецептор-опосредованная генная доставка, доставка, опосредованная полилизином, 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.

[0170] 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.

[0171] Применяемый в данном документе термин «криоконсервировать» относится к консервации клеток посредством охлаждения до температур ниже нуля, например, (как правило) 77 K или -196°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 $1-3^{\circ}\text{C}/\text{минута}$.

[0172] 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).

[0173] 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.

[0174] Необходимые для лечения количества клеток в композиции обычно составляют по меньшей мере 2 клетки (*например*, по меньшей мере 1 CD8⁺ центральная запоминающая Т-клетка и по меньшей мере 1 CD4⁺ Т-клетка хелперной субпопуляции), или более типично составляют более 10² клеток, и не более 10⁶, не более 10⁸ или 10⁹ клеток включительно и могут составлять более 10¹⁰ клеток. Количество клеток будет зависеть от необходимого применения, для которого предназначена композиция, и типа клеток, включенных в данный документ. Плотность необходимых клеток обычно превышает 10⁶ клеток/мл и, как правило, превышает 10⁷ клеток/мл, как правило, 10⁸ клеток/мл или более. Клинически подходящее количество иммунных клеток может быть разделено на несколько инфузий, которые суммарно равны или превышают 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹, 10¹⁰, 10¹¹ или 10¹² клеток. В некоторых 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 10⁶/кг (10⁶ -10¹¹ 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.

[0175] Экспрессирующие CAR популяции клеток по настоящему изобретению можно вводить либо отдельно, либо в виде фармацевтической композиции в комбинации с разбавителями и/или с другими компонентами, *например*, IL-2 или другими цитокинами, или популяциями клеток. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению может содержать экспрессирующую CAR или TCR популяцию клеток, *например*, Т-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.

[0176] 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 регуляции 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. Инъецируемая фармацевтическая композиция предпочтительно является стерильной.

[0177] 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.

[0178] 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.

[0179] 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:

[0180] 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.

[0181] Термин «активность FLT3» включает любой биологический эффект FLT3. В некоторых вариантах осуществления активность FLT3 включает способность FLT3 взаимодействовать или связываться с субстратом или рецептором.

[0182] 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, фосфоанилотиоат, фосфоаниладат и фосфоамидат.

[0183] 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 бессмысловые олигонуклеотиды. Олигонуклеотид может включать метку, в том числе радиоизотопную метку, флуоресцентную метку, гаптемовую или антигенную метку, для анализа обнаружения. Олигонуклеотиды могут применяться, например, в качестве праймеров ПЦР, клонирующих праймеров или гибридизационных зондов.

[0184] Термин «контрольная последовательность» относится к полинуклеотидной последовательности, которая 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.

[0185] Применяемый в данном документе термин «функционально связанный» означает, что компоненты, к которым применяется данный термин, находятся в связи, которая позволяет им осуществлять присущие им функции в пригодных условиях.

[0186] 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.

[0187] 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.

[0188] 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.

[0189] 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.

[0190] 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.

[0191] 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 amino-концевую 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, переменные домены тяжелой и/или легкой цепи, часть других частей цепи антитела и т.п.

[0192] 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.

[0193] «Вариант» полипептида (*например*, антигенсвязывающая молекула или антитело) содержит аминокислотную последовательность, в которой один или несколько аминокислотных остатков введены внутрь, удалены из и/или замещены в аминокислотной последовательности относительно другой полипептидной последовательности. Варианты включают слитые белки.

[0194] 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»).

[0195] 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.

[0196] 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 неприродного 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-карбоксихлутамат, 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 амино концевое направление, а правостороннее направление представляет собой карбоксильное концевое направление, в соответствии со стандартным применением и условностями.

[0197] 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:

гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

кислотные: Asp, Glu;

основные: His, Lys, Arg;

остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro; и

ароматические: Trp, Tyr, Phe.

[0198] 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.

[0199] В осуществлении изменений антигенсвязывающей молекулы костимулирующий или активирующий 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); аспартат (-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 таблице 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	Arg
	Acid, Gln, Asn	
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala,	Leu

	Tyr	
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,	Leu
	Ala, норлейцин	

[0200] 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.

[0201] 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.

[0202] 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.

[0203] 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.

[0204] 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.

[0205] 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.

[0206] Следующий последовательности будут дополнительно иллюстрировать настоящее изобретение.

[0207] CD28Т ДНК внеклеточная, трансмембранная, внутриклеточная
СТТGATAATGAAAAGTC

AAACGGAACAATCATTACGTGAAGGGCAAGCACCTCTGTCCGTCACCCTTGTTCCTG
TGGTCCATCCAAGCCATTCTGGGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGAGTCCTCGCTTGTTA
CTCTCTGCTCGTCACCGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTTAGATCCAAAAGAAGCCG
CCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAA
ACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGC (SEQ ID
NO: 1)

[0208] CD28Т внеклеточная, трансмембранная, внутриклеточная AA:

LDNEKSNGTI IHVKGKHLCP SPLFPGPSKP FWVLVVVGGV LACYSLLVTV
AFIIFWVRSK RSLLHSDYM NMTPRRPGPT RKHYQPYAPP RDFAAAYS (SEQ ID NO:
2)

CD28Т ДНК - внеклеточная

[0209]

СТТGATAATGAAAAGTCAAACGGAACAATCATTACGTGAAGGGCAAGCACCTCTG
TCCGTCACCCTTGTTCCTGGTCCATCCAAGCCA (SEQ ID NO: 3)

[0210] CD28Т AA - внеклеточная

LDNEKSNGTI IHVKGKHLCP SPLFPGPSKP (SEQ ID NO: 4)

[0211] CD28 ДНК трансмембранный домен

TTCTGGGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGAGTCCTCGCTTGTTACTCTCTGCTCGT
CACCGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTT (SEQ ID NO: 5)

[0212] CD28 AA трансмембранный домен:

FWVLVVVGGV LACYSLLVTV AFIFWV (SEQ ID NO: 6)

[0213] CD28 DNA внутриклеточный домен:

AGATCCAAAAGAAGCCGCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCAC
GCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTC
GCTGCCTATCGGAGC (SEQ ID NO: 7)

[0214] CD28 AA внутриклеточный домен

RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 8)

[0215] CD3 дзета ДНК

AGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGA
ACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGAC
AAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAACCCCC
AGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAA
ATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGCAGGTTTGTACCAGG
GACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCAC
CTAGG (SEQ ID NO: 9)

[0216] CD3 дзета AA

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR (SEQ ID NO: 10)

[0217] CD28 ДНК

ATTGAGGTGATGTATCCACCGCCTTACCTGGATAACGAAAAGAGTAACGGTA
CCATCATTACGTGAAAGGTAAACACCTGTGTCCTTCTCCCCTCTCCCCGGGCCATC
AAAGCCC (SEQ ID NO: 11)

[0218] CD28 AA

IEVMYPPPYL DNEKSNGTII HVKKGKHLCP S PLFPGPSKP (SEQ ID NO: 12)

[0219] CD8 ДНК внеклеточный и трансмембранный домен

GCTGCAGCATTGAGCAACTCAATAATGTATTTTAGTCACTTTGTACCAGTGTT
CTTGCCGGCTAAGCCTACTACCACACCCGCTCCACGGCCACCTACCCCAGCTCCTAC
CATCGCTTCACAGCCTCTGTCCCTGCGCCAGAGGCTTGCCGACCGGCCGCAGGGGG
CGCTGTTCATAACCAGAGGACTGGATTTGCGCTGCGATATCTATATCTGGGCACCCCT
GGCCGGAACCTGCGGCGTACTCCTGCTGTCCCTGGTCATCACGCTCTATTGTAATCA
CAGGAAC (SEQ ID NO: 13)

[0220] CD8 AA внеклеточный и трансмембранный домен

AAALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPARTIASQPLSLRPEACRPAAGGA
VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN (SEQ ID NO: 14)

[0221] Клон 10E3 HC ДНК

CAGGTCACCTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGTGAAACCCACAGAGACCC
TCACGCTGACCTGCACCGTCTCTGGGTCTCACTCATCAATGCTAGAATGGGTGTGA
GCTGGATCCGTCAGCCCCAGGGAAGGCCCTGGAGTGGCTTGACACATTTTTTCGA
ATGCCGAAAATCGTACAGGACATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATCTCCAAGGAC

ACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCTTACCATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGC
CACATATACTGTGCACGGATAACCAGGCTACGGTGGTAACGGGGACTACCACTACT
ACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:
15)

[0222] Клон 10E3 HC AA - CDR подчеркнуты

QVTLKESGPVLVKPTETLTLCTVSGFSLNARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFS
NAEKSYRTSLKSRLTISKDTSKSQVVLTMTNMDPVDTATYYCARIPGYGGNGDYHYYG
MDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 16)

[0223] Клон 10E3 HC AA CDR1: NARMGVS (SEQ ID NO: 17)

[0224] Клон 10E3 HC AA CDR2: HIFSNAEKSYRTSLKS (SEQ ID NO: 18)

[0225] Клон 10E3 HC AA CDR3: IPGYGGNGDYHYYGMDV (SEQ ID NO: 19)

[0226] Клон 10E3 LC ДНК

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTCTAGGAGACAG
AGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCA
GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTTCATCCACTTTGCAA
GTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCCTCTCACA
ATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAAT
TTCCCGTGGACGTTTCGGTCAGGGAACGAAGGTGGAAATCAAACGA (SEQ ID NO: 20)

[0227] Клон 10E3 LC AA (CDR подчеркнуты)

DIQMTQSPSSLSASLGDRVITITCRASQGIRNDLGWYQKPKGKAPKRLIYASSTLQ
SGVPSRFSSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNNFPWTFGQGTKVEIKR (SEQ ID
NO: 21)

[0228] Клон 10E3 LC CDR1 AA: RASQGIRNDLG (SEQ ID NO: 22)

[0229] Клон 10E3 LC CDR2 AA: ASSTLQS (SEQ ID NO: 23)

[0230] Клон 10E3 LC CDR3 AA: LQHNNFPWT (SEQ ID NO: 24)

[0231] Клон 2E7 HC ДНК

CAGGTCACCTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGTGAAACCCACAGAGACCC
TCACGCTGACCTGCACCGTCTCTGGGTTCTCACTCAGGAATGCTAGAATGGGTGTAA
GCTGGATCCGTCAGCCTCCCGGGAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCACACATTTTTTCGA
ATGACGAAAAAACCTACAGCACATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATCTCCAGGGAC
ACCTCCAAAGGCCAGGTGGTCCTTACCATGACCAAGATGGACCCTGTGGACACAGC
CACATATACTGTGCACGGATAACCCTACTATGGTTCGGGGAGTCATAACTACGGTAT
GGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:25)

[0232] Клон 2E7 HC AA (CDR подчеркнуты)

QVTLKESGPVLVKPTETLTLCTVSGFSLRNARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFS
NDEKTYSTSLKSRLTISRDTSKGQVVLMTKMDPVDTATYYCARIPYYGSGSHNYGMD
VWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:26)

[0233] Клон 2E7 HC AA CDR1: NARMGVS (SEQ ID NO:17)

[0234] Клон 2E7 HC AA CDR2: HFSNDEKTYSTSLKS (SEQ ID NO:26)

[0235] Клон 2E7 HC AA CDR3: IPYYGSGSHNYGMDV (SEQ ID NO:27)

[0236] Клон 2E7 LC ДНК

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG
AGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGACATTAGAAATGATTTCCGGCTGGTATCA
ACAGAAACCAGGGAAAGCCCCTCAGCGCCTGCTCTATGCTGCATCCACTTTGCAAA
GTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGGTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATCACTCTACA
ATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGTATAATACT
TACCCGTGGACGTTCCGGTCAGGGAACGAAGGTGGAAATCAAACGA (SEQ ID NO: 28)

[0237] Клон 2E7 LC AA (CDR подчеркнуты)

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDIRNDFGWYQQKPGKAPQRLLYAASTLQ
SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYNTYPWTFGGQGTKVEIKR (SEQ ID
NO: 29)

[0238] Клон 2E7 LC AA CDR1: RASQDIRNDFG (SEQ ID NO: 30)

[0239] Клон 2E7 LC AA CDR2: AASTLQS (SEQ ID NO: 31)

[0240] Клон 2E7 LHC AA CDR3: LQYNTYPWT (SEQ ID NO: 32)

[0241] Клон 8B5 HC ДНК

CAGATACAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGTAGCGTCTGGATTCACCTTCAAGA ACTATGGCATGCACTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATTTGGTATGATGGA
AGTAATGAATACTATGGAGACCCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA
CTCCAAGAACATGTTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGATGACACGGCTG
TGTATTACTGTGCGAGGTCGGGAATAGCAGTGGCTGGGGCCTTTGACTACTGGGGCC
AGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 33)

[0242] Клон 8B5 HC AA (CDR подчеркнуты)

QIQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASF^TFKNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIW
YDGSNEYYGDPVKGRFTISRDNSKNMLYLQMNSLRADDTAVYYCARSGIAVAGAFDY
WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 34)

[0243] Клон 8B5 HC AA CDR1: NYGMH (SEQ ID NO: 34)

[0244] Клон 8B5 HC AA CDR2: VIWYDGSNEYYGDPVKG (SEQ ID NO: 35)

[0245] Клон 8B5 HC AA CDR3: SGIAVAGAFDY (SEQ ID NO: 36)

[0246] Клон 8B5 LC ДНК

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAA
AAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTTCTTGGCCTGGT
ACCAGCAGAAACCTGGACAGGCTCCCAGTCTCCTCATCTATGTTGCATCCAGAAGGG
CCGCTGGCATCCCTGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCA
CCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGGAAATGTTTTACTGTCAACACTATGGTA
GGACACCATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGA (SEQ ID NO:
37)

[0247] Клон 8B5 LC AA (CDR подчеркнуты)

EIVLTQSPDTLSLSPGEKATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPSLLIYVASRRA
AGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFGMFYQCQHYGRTPFTFGPGTKVDIKR (SEQ ID
 NO:41)

[0248] Клон 8B5 LC AA CDR1: RASQSVSSSFLA (SEQ ID NO: 38)

[0249] Клон 8B5 LC AA CDR2: VASRRAA (SEQ ID NO: 39)

[0250] Клон 8B5 LC AA CDR3: QHYGRTPFT (SEQ ID NO: 40)

[0251] Клон 4E9 HC ДНК

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAG
 TGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCGGCTACTATATACACTGGG
 TGCACAGGCCCTGAACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACCCTAACAGT
 GGTGGCACAACACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGGCCAGGGACAC
 GTCCATCAGCACAGTTTACATGGACCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCG
 TGTATTACTGTGCGAGAATACGCGGTGGTAACTCGGTCTTTGACTACTGGGGCCAGG
 GAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 41)

[0252] Клон 4E9 HC AA (CDR подчеркнуты)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGY^YY^IH^WV^RQ^APE^QGLE^WM^GW^IN
PNSGGTNYAQKFQGRVTMARDTSISTVYMDLSRLRSDDTAVYYCAR^IR^GG^NS^VF^DY^W
 GQGLVTVSS (SEQ ID NO: 42)

[0253] Клон 4E9 HC AA CDR1: GYYIH (SEQ ID NO: 43)

[0254] Клон 4E9 HC AA CDR2: WINPNSGGTNYAQKFQG (SEQ ID NO: 44)

[0255] Клон 4E9 HC AA CDR3: IRGGNSVFDY (SEQ ID NO: 45)

[0256] Клон 4E9 LC ДНК

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGA
 GGGCCACCATCAACTGCAAGTCCACCCAGAGTATTTTATACACCTCCAACAATAAGA
 ACTTCTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCTAAACTGCTCATTTCT
 GGGCATCTATCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTGAGTGGCAGCGGGTCTGGG
 ACAGATTTGCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTAC
 TGTCAACAATATTTTAGTACTATGTTGAGTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATC
 AAACGA (SEQ ID NO: 46)

[0257] Клон 4E9 LC AA (CDR подчеркнуты)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK^ST^QS^IL^YT^SN^NK^NF^LA^WY^QQ^KP^GQ^PP^KL^LI^S
WASIRE^SG^VP^DR^FS^GS^GS^GT^DF^AL^TI^SS^LQ^AE^DV^AV^YY^CQ^QY^FS^TM^FS^FG^QG^TK^LE^IK^R
 (SEQ ID NO: 47)

[0258] Клон 4E9 LC AA CDR1: KSTQSILYTSNNKNFLA (SEQ ID NO: 48)

[0259] Клон 4E9 LC AA CDR2: WASIRES (SEQ ID NO: 49)

[0260] Клон 4E9 LC AA CDR3: QQYFSTMFS (SEQ ID NO: 50)

[0261] Клон 11F11 HC ДНК

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCC
 TGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTGGTGCATACTACTGGA
 CTTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCCATTAC

AGTGGGAGCACCTACTCCAACCCGTCCTCAAGAGTCGAATTACCATATCGTTAGAC
ACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAACTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCC
GTGTATTACTGTGCGAGACAAGAGGACTACGGTGGTTTGTGGTACTACTGGGGCCAG
GGAACCCTGGTCACCGTTTCCTCA (SEQ ID NO: 51)

[0262] Клон 11F11 HC AA (CDR подчеркнуты)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGAYYWTWIRQHPGKGLEWIGYIH
SGSTYSNPSLKSRITISLDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARQEDYGGFLFDYWGQGT
LVTVSS (SEQ ID NO: 52)

[0263] Клон 11F11 HC AA CDR1: SGAYYWT (SEQ ID NO: 53)

[0264] Клон 11F1 HC AA CDR2: YIHYSGSTYSNPSLKS (SEQ ID NO: 54)

[0265] Клон 11F1 HC AA CDR3: QEDYGGFLFDY (SEQ ID NO: 55)

[0266] Клон 11F11 LC ДНК

GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAA
GAATCACCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTACCACCGACTTAGCCTGGTACC
AGCAGATGCCTGGACAGGCTCCCCGGCTCCTCATCTATGATGCTTCCACCAGGGCCA
CTGGTTTCCCAGCCAGATTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACGCTACCA
TCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAACATTATAAAACCT
GGCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACTAAGGTGGAGATCAAACGA (SEQ ID NO: 56)

[0267] Клон 11F11 LC AA (CDR подчеркнуты)

EIVMTQSPATLSVSPGERITLSCRASQSVTTDLAWYQQMPGQAPRLLIYDASTRA
TGFPARFSGSGSGTDFLTISLQAEDFAVYYCQHYKTWPLTFGGGTKVEIKR (SEQ ID
NO: 57)

[0268] Клон 11F11 LC AA CDR1: RASQSVTTDLA (SEQ ID NO: 58)

[0269] Клон 11F1 LC AA CDR2: DASTRAT (SEQ ID NO: 59)

[0270] Клон 11F1 LC AA CDR3: QHYKTWPLT (SEQ ID NO: 60)

[0271] Конструкция 10E3 CD28 ДНК (сигнальная последовательность выделена
жирным шрифтом)

ATGGCACTCCCCGTAACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGC
ACGCCGCACGCCCGCAGGTGACCCTCAAAGAGTCTGGACCCGTGCTCGTAAAACC
TACGGAGACCCTGACACTCACCTGCACAGTCTCCGGCTTCAGCCTCATCAATGCCAG
GATGGGAGTTTCTGGATCAGGCAACCGCCCGGAAAGGCCCTGGAATGGCTCGCAC
ATATTTTCAGTAACGCTGAAAAAAGCTATCGGACTTCTCTGAAAAGTCGGCTCACGA
TTAGTAAGGACACATCCAAGAGCCAAGTGGTGCTTACGATGACTAACATGGACCCT
GTGGATACTGCAACCTATTACTGTGCTCGAATCCCTGGTTATGGCGGAAATGGGGAC
TACCACTACTACGGTATGGATGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTACTGTTTCAAGC
GGAGGGGGAGGGAGTGGGGGTGGCGGATCTGGCGGAGGAGGCAGCGATATCCAGA
TGACGCAGTCCCCTAGTTCACTTTCGCATCCCTGGGGGATCGGGTTACCATTACAT
GCCGCGCGTCACAGGGTATCCGGAATGATCTGGGATGGTACCAGCAGAAGCCGGGA
AAGGCTCCTAAGCGCCTCATCTACGCCAGCTCCACCCTGCAGAGTGGAGTGCCCTCC
CGGTTTT**CAGGCAGTGGCTCCGGTACGGAGTTTACTCTTACAATTAGCAGCCTGCAG**

CCAGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTTTGCAGCATAATAATTTCCCCTGGACCTTTG
 GTCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAAAGAGCAGCCGCCATCGAAGTAATGTATCCC
 CCCCCGTACCTTGACAATGAGAAGTCAAATGGAACCATTATCCATGTTAAGGGCAA
 ACACCTCTGCCCTTCTCCACTGTTCCCTGGCCCTAGTAAGCCGTTTTGGGTGCTGGTG
 GTAGTCGGTGGGGTGCTGGCTTGTTACTCTTCTCTCGTGACCGTCGCCTTTATAATCT
 TTTGGGTCAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTC
 CACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGAT
 TTCGCTGCCTATCGGAGCCGAGTGAAATTTTCTAGATCAGCTGATGCTCCCGCCTAT
 CAGCAGGGACAGAATCAACTTTACAATGAGCTGAACCTGGGTGCGAGAGAAGAGTA
 CGACGTTTTGGACAAACGCCGGGGCCGAGATCCTGAGATGGGGGGGAAGCCGAGA
 AGGAAGAATCCTCAAGAAGGCCTGTACAACGAGCTTCAAAAAGACAAAATGGCTGA
 GGCGTACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGACGAGGCAAGGGTCACGAT
 GGCTTGTATCAGGGCCTGAGTACAGCCACAAAGGACACCTATGACGCCCTCCACAT
 GCAGGCACTGCCCCACGCTAG (SEQ ID NO: 61)

[0272] Конструкция 10E3 CD28 AA (сигнальная последовательность выделена жирным шрифтом; CDR подчеркнуты)

MALPVTALLLPLALLHAARPQVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLINAR
MGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSNAEKSYRTSLKSRLTIKDTSKSQVVLTMTNMDPVDT
 ATYYCARIPGYGGNGDYHYYGMDVWVGQTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQ
 SPSSLSASLGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYASSTLQSGVPSRFSGSGS
 GTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNNFPWTFGQGTKVEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSN
 GTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHS
 DYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL
 GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG
 KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR (SEQ ID NO: 62)

[0273] Конструкция 10E3 CD28T ДНК (сигнальная последовательность выделена жирным шрифтом)

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGC
ACGCCGCACGCCCGCAAGTACTTTGAAGGAGTCTGGACCTGTACTGGTGAAGCC
 AACCGAGACACTGACACTCACGTGTACAGTGAGTGGTTTTTCTTGATCAACGCAAG
 GATGGGCGTCAGCTGGATCAGGCAACCCCTGGCAAGGCTCTGGAATGGCTCGCTC
 ACATATTCAGCAATGCCGAAAAAAGCTACCGGACAAGCCTGAAATCCCGCCTGACT
 ATTTCCAAGGACACTTCTAAGTCTCAGGTGGTGTGACCATGACCAACATGGACCCG
 GTGGACACCGCCACCTATTACTGCGCAAGAATCCCTGGGTATGGTGGGAATGGTGA
 CTACCATTATTATGGGATGGATGTGTGGGGGCAAGGCACAACCGTAACGGTCTCAA
 GCGGTGGGGGAGGCTCAGGGGGCGGAGGCTCCGGAGGTGGCGGCTCCGACATTCAG
 ATGACCCAAAGCCCGTCCAGCCTGTCCGCCAGCCTGGGAGATAGAGTGACAATCAC
 GTGTAGAGCTTCCCAAGGGATAAGAAATGATCTCGGGTGGTATCAGCAGAAGCCCG
 GCAAAGCCCCAAAAGGCTTATATATGCTAGTAGTACACTGCAGTCTGGAGTTCCTT
 CCCGATTTTCAGGTAGCGGCTCCGGTACAGAGTTCACCCTCACGATAAGCTCACTCC

AGCCTGAGGATTTTCGCAACGTACTIONACTGCCTCCAGCACACAATAATTTTCCCTGGACTT
 TCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGAGGGCCGCTGCCCTTGATAATGAAAAG
 TCAAACGGAACAATCATTACGTGAAGGGCAAGCACCTCTGTCCGTCACCCTTGTTCC
 CCTGGTCCATCCAAGCCATTCTGGGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGAGTCCTCGCTTGT
 TACTCTCTGCTCGTCACCGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTTAGATCCAAAAGAAGCC
 GCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGA
 AACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCCGAGTGA
 AATTTTCTAGATCAGCTGATGCTCCCGCCTATCAGCAGGGACAGAATCAACTTTACA
 ATGAGCTGAACCTGGGTGCGAGAGAAGAGTACGACGTTTTGGACAAACGCCGGGGC
 CGAGATCCTGAGATGGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAATCCTCAAGAAGGCCTGT
 ACAACGAGCTTCAAAAAGACAAAATGGCTGAGGCGTACTCTGAGATCGGCATGAAG
 GGCGAGCGGAGACGAGGCAAGGGTCACGATGGCTTGTATCAGGGCCTGAGTACAGC
 CACAAAGGACACCTATGACGCCCTCCACATGCAGGCACTGCCCCCACGCTAG (SEQ
 ID NO: 63)

[0274] Конструкция 10E3 CD28T AA (сигнальная последовательность выделена жирным шрифтом; CDR подчеркнуты)

MALPVTALLPLALLHAARPQVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLINAR
MGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSNAEKSYRTSLKSRLTIKDTSKSQVVLMTNMDPVDT
 ATYYCARIPGYGGNGDYHYYGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQ
 SPSSLSASLGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYASSTLQSGVPSRFSGSGS
 GTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNNFPWTFGQGTKVEIKRAAALDNEKSNGTIIHVKKG
 HLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPR
 RPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL
 DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQ
 GLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 64)

[0275] Конструкция 10E3 CD8 ДНК (сигнальная последовательность выделена жирным шрифтом)

ATGGCACTCCCCGTAACCTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGC
ACGCCGCACGCCCGCAGGTGACACTCAAGGAATCAGGGCCCGTACTGGTGAAACC
 TACTGAGACCCTGACACTGACTTGCACCGTGTCTGGGTCTCTCTGATTAACGCTCG
 AATGGGTGTGAGTTGGATACGCCAGCCTCCAGGGAAGGCTCTGGAGTGGTTGGCCC
 ACATTTTCTCCAACGCCGAGAAGAGCTACAGGACTAGTCTGAAGTCCAGACTTACCA
 TTTCCAAAGACACAAGTAAATCACAGGTGGTGCTGACAATGACAAACATGGACCCG
 GTTGATACTGCTACCTATTATTGTGCCCGCATTCCCGGCTACGGCGGCAATGGCGAC
 TATCACTATTATGGTATGGATGTCTGGGGGCAGGGGACCACTGTTACCGTGTCCAGC
 GGGGGTGGTGGCAGCGGAGGTGGAGGGAGCGGTGGTGGGGGGAGTGATATTCAGA
 TGACCCAGAGCCCTAGCTCTCTTTCCGCTTCTCTGGGCGATAGAGTCACCATCACCT
 GCCGGGCCTCTCAAGGCATCCGGAACGATCTTGGATGGTATCAGCAGAAGCCCGGC
 AAGGCACCAAAAAGGCTGATCTACGCATCAAGCACCTGCAATCTGGGGTGCCGTC
 CCGGTTTTCTGGTTCTGGTAGTGGGACCGAGTTTACTCTGACTATTTCTCCCTGCAG

CCTGAGGACTTTGCTACGTA CTATTGTCTGCAGCATAACA ACTTCCCCTGGACGTTCC
 GGGCAGGGTACGAAAGTGGAAATTAAGCGCGCCGCCCTGTCCA ACTCCATTAT
 GTATTTCTCTCATT TTTGTCCCAGTGTTCCCTGCCC GCTAAACCCACA ACTACTCCGGCG
 CCCC GACCGCCA ACTCCC GCACCTACCATCGCAAGCCAGCCATTGAGCCTCCGACCT
 GAGGCATGTAGACCAGCAGCCGGCGGTGCCGTGCACACAAGGGGACTGGATTTCGC
 CTGCGACATATATATTTGGGCCCCCTCTGGCTGGAACCTGTGGGGTTCTGCTGCTCTCT
 CTCGTTATTACACTGTATTGCAATCATCGCAATAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTC
 CATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTA
 CCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCCGAGTGAAATTTTC
 TAGATCAGCTGATGCTCCCGCCTATCAGCAGGGACAGAATCAACTTTACAATGAGCT
 GAACCTGGGTCGCAGAGAAGAGTACGACGTTTTGGACAAACGCCGGGGCCGAGATC
 CTGAGATGGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAATCCTCAAGAAGGCCTGTACAACGA
 GCTTCAAAAAGACAAAATGGCTGAGGCGTACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAGC
 GGAGACGAGGCAAGGGTCACGATGGCTTGTATCAGGGCCTGAGTACAGCCACAAAG
 GACACCTATGACGCCCTCCACATGCAGGCACTGCCCCCACGCTAG (SEQ ID NO: 65)

[0276] Конструкция 10E3 CD8 AA (сигнальная последовательность выделена жирным шрифтом; CDR подчеркнуты)

MALPVTALLLPLALLHAARPQVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLINAR
MGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSNAEKSYRTSLKSRLTIKDTSKSQVVLMTNMDPVDT
 ATYYCAR**IPGYGGNGDYHYYGMDV**WGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQ
 SPSSLSASLGDRVTIT**CRA**SQ**GIRNDL**GWYQKPKGAPKRLIY**ASSTLQ**SGVPSRFSGSGS
 GTEFTLTISSLQPEDFATYY**CLQHNNFPWT**FGQGTKVEIKRAAALSNSIMYFSHFVPVFLP
 AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCG
 VLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRV
 KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY
 NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ
 ID NO: 66)

[0277] Конструкция 8B5 CD28 ДНК (сигнальная последовательность выделена жирным шрифтом)

ATGGCACTCCCCGTAACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGC
ACGCCGCACGCCCGCAGATCCAGTTGGTGGAAATCAGGGGGCGGTGTGGTGCAGCC
 GGGTAGGAGCCTGAGACTGTCATGCGTGGCGTCTGGCTTCACATTCAAGAACTACG
 GCATGCACTGGGTGCGACAGGCCCGGAAAGGGTTTGGAGTGGGTGCGCCGTGATC
 TGGTACGACGGATСТАATGAGTATTACGGAGATCCTGTGAAGGGAAGGTTCACCAT
 CTCCCGCGACAATAGCAAAAATATGCTCTACCTGCAAATGAACTCACTCAGGGCGG
 ATGATACGGCGGTCTACTATTGCGCTCGCTCAGGGATTGCTGTGGCCGGCGCATTCG
 ATTACTGGGGACAGGGTACCCTGGTGACAGTATCAAGCGGAGGCGGGCTCTGGC
 GGCGGCGGATCTGGCGGGGGGGGAAGTGAGATTGTGTTGACACAGTCTCCCGATAC
 CCTGTCACTGTCACCCGGCGAGAAGGCAACGCTGAGTTGCAGAGCAAGCCAGTCAG
 TCTCCTCTTCTTTTCTGGCCTGGTATCAGCAAAAACCAGGTCAGGCACCATCTCTCCT

GATTTACGTTGCCAGCAGACGGGCGGCTGGCATTCCCGACAGGTTCTCTGGAAGCG
 GATCTGGGACCGATTTTACCCTGACAATTAGCCGCTTGGAGCCCGAAGACTTTGGTA
 TGTTTTACTGCCAGCACTACGGAAGGACACCTTTCACATTTGGCCCCGGGCACGAAAG
 TCGATATAAAACGCGCAGCCGCCATTGAAGTAATGTACCCACCACCTTATTTGGACA
 ATGAAAAGTCCAATGGTACCATTATTCACGTCAAGGGAAAGCATCTCTGTCCAAGCC
 CTCTGTTCCCCGGCCCCCTCCAAACCATTCTGGGTGCTGGTGGTCGTCGGCGGAGTTC
 TGGCCTGCTATTCTCTGCTCGTGACTGTTGCATTCATCATTTTCTGGGTGAGATCCAA
 AAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCC
 CACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTGCTGCCTATCGGA
 GCCGAGTGAAATTTTCTAGATCAGCTGATGCTCCCGCCTATCAGCAGGGACAGAATC
 AACTTTACAATGAGCTGAACCTGGGTGCGCAGAGAAGAGTACGACGTTTTGGACAAA
 CGCCGGGGCCGAGATCCTGAGATGGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAATCCTCAAG
 AAGGCCTGTACAACGAGCTTCAAAAAGACAAAATGGCTGAGGCGTACTCTGAGATC
 GGCATGAAGGGCGAGCGGAGACGAGGCAAGGGTCACGATGGCTTGTATCAGGGCCT
 GAGTACAGCCACAAAGGACACCTATGACGCCCTCCACATGCAGGCACTGCCCCCAC
 GCTAG (SEQ ID NO: 67)

[0278] Конструкция 8B5 CD28 AA (сигнальная последовательность выделена жирным шрифтом)

MALPVTALLPLALLHAARPQIQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFKNY
 GMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDYDGSNEYYGDPVKGRFTISRDNLSKNMLYLQMNSLRA
 DDTAVYYCARSGIAVAGAFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPDRL
 SLSPGEEKATLSCRASQSVSSSFLAWYQKPKGQAPSLLIYVASRRAAGIPDRFSGSGGTD
 FTLISRLEPEDFGMFCYQHYGRTPFTFGPGTKVDIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTII
 HVK GKHLCPSPFPGPSKPFWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYM
 NMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
 EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
 DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 68)

[0279] Конструкция 8B5 CD28Т ДНК (сигнальная последовательность выделена жирным шрифтом)

ATGGCACTCCCGTAACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGC
ACGCCGCACGCCCGCAGATTCAGCTCGTGGAGTCAGGTGGTGGCGTGGTTCAGCC
 CGGACGGTCCCTGCGACTCTCTTGTGTGGCAAGCGGATTTACCTTTAAGAACTATGG
 CATGCACTGGGTGAGGCAGGCCCTGGAAAAGGACTGGAGTGGGTGCTGTGATCT
 GGTACGACGGGTCCAACGAATATTATGGCGATCCTGTGAAGGGACGGTTTACAATC
 TCACGCGATAACTCAAAGAACATGCTGTACCTGCAAATGAACTCTCTGCGCGCTGAT
 GACACTGCCGTGTATTATTGCGCTCGGAGTGGTATCGCCGTCGCAGGAGCATTTGAT
 TATTGGGGGCAAGGGACCCTCGTGACAGTGAGTCCGGAGGGGGAGGTTCTGGTGG
 AGGCGGCTCTGGTGGGGGAGGCAGCGAGATCGTTCTGACCCAGTCTCCTGACACAC
 TGTCACTGTCCCCTGGTGAAAAGGCCACACTGTCTTGTAGAGCGTCCCAGAGCGTTT
 CCAGTTCCTTCCTTGCATGGTATCAACAAAAACCCGGGCAGGCTCCAAGCTTGCTGA

TCTACGTGGCCAGCCGCCGGGCCGAGGCATCCCTGATAGGTTTAGCGGTTCTGGGA
 GCGGGACGGACTTCACCTTGACAATATCACGGCTGGAACCCGAAGACTTCGGAATG
 TTTTATTGCCAGCACTACGGAAGAACTCCATTACCTTTGGCCCCGGAACGAAGGTA
 GACATCAAGAGAGCAGCAGCCCTCGACAACGAGAAATCCAATGGAACCATTATCCA
 TGTGAAGGGGAAACATCTCTGCCCTTACCATTGTTCCCTGGACCCAGCAAGCCTTT
 TTGGGTTCTGGTCGTGGTGGGGGGCGTCCTGGCTTGTACTCCCTCCTCGTTACAGTC
 GCCTTCATAATCTTTTGGGTAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTAC
 ATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGC
 ACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCCGAGTGAAATTTTCTAGATCAGCTGA
 TGCTCCCGCCTATCAGCAGGGACAGAATCAACTTTACAATGAGCTGAACCTGGGTCG
 CAGAGAAGAGTACGACGTTTTGGACAAACGCCGGGGCCGAGATCCTGAGATGGGGG
 GGAAGCCGAGAAGGAAGAATCCTCAAGAAGGCCTGTACAACGAGCTTCAAAAAGA
 CAAAATGGCTGAGGCGTACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGACGAGGC
 AAGGGTCACGATGGCTTGTATCAGGGCCTGAGTACAGCCACAAAGGACACCTATGA
 CGCCCTCCACATGCAGGCACTGCCCCACGCTAG (SEQ ID NO: 69)

[0280] Конструкция 8B5 CD28T AA (сигнальная последовательность выделена жирным шрифтом)

MALPVTALLPLALLHAARPQILVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFKNY
 GMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNEYYGDPVKGRFTISRDNKNMLYLQMNSLRA
 DDTAVYYCARSGIAVAGAFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPDTL
 SLSPGEKATLSCRASQSVSSSFLAWYQKPGQAPSLLIYVASRRAAGIPDRFSGSGGTD
 FTLTISRLEPEDFGMFYQCQHYGRTPFTFGPGTKVDIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHL
 PSPLFPGPSKPFVVLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPG
 PTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDR
 RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLST
 ATKD TYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 70)

[0281] Конструкция 8B5 CD8 ДНК (сигнальная последовательность выделена жирным шрифтом)

ATGGCACTCCCCGTAACCTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGC
ACGCCGCACGCCCGCAGATACAGCTTGTCGAATCCGGTGGCGGGGTGGTGCAGCC
 TGGACGCAGCCTGCGGCTTTCTTGCGTGGCCAGCGGATTTACCTTCAAGAACTACGG
 GATGCATTGGGTCCGCCAGGCACCCGGCAAAGGCCTTGAGTGGGTTGCAGTGATCT
 GGTACGACGGCAGTAACGAGTATTATGGCGACCCCGTGAAGGGAAGGTTTACTATT
 TCAAGAGATAATAGTAAGAACATGTTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCGGA
 CGACACTGCCGTGTACTACTGTGCTCGCTCCGGCATCGCTGTGGCAGGGGCCTTTGA
 CТАCTGGGGTCAGGGGACGCTGGTCACGGTTAGTTCCGGGGGCGGTGGTTCCGGAG
 GAGGCGGTTCCGGCGGGCGGCGGATCAGAAATCGTTCTTACTCAGAGTCCCAGATACG
 CTGTCCTTGTCTCCGGGAGAAAAAGCCCACTGAGCTGCCGAGCCTCACAGTCAGTA
 AGTTCTTCATTCCTCGCCTGGTACCAGCAAAAACCGGGGCAGGCCCTTCCCTGCTT
 ATCTACGTGGCCTCTAGGAGAGCCGCCGGTATTCTGACCGGTTACGCGGAAGTGGT

TCCGGGACTGATTTTACGCTCACGATCTCCCGATTGGAGCCCGAGGATTTCCGGGATG
 TTCTACTGTCAGCATTATGGAAGAACGCCCTTACCTTCGGTCCGGGAACCTAAGGTT
 GATATTAAGCGGGCTGCTGCCCTTAGCAACTCCATCATGTATTTTTCTCACTTCGTGC
 CAGTATTCCTGCCAGCCAAACCGACCACAACCCCAGCACCTAGACCTCCTACTCCCG
 CTCCCACCATAGCTTCACAGCCGCTGAGTTTGAGGCCAGAGGCCTGTCCGGCCTGCTG
 CAGGCGGAGCAGTTCACACCAGGGGACTTGACTTTGCATGTGACATCTATATTTGGG
 CTCCACTGGCGGGAACCTGCGGGGTGCTCCTTTTGTCACTCGTTATCACACTGTATTG
 CAATCATAGGAATAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATA
 TGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTA
 GAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCCGAGTGAAATTTTCTAGATCAGCTGATGCTCCCG
 CCTATCAGCAGGGACAGAATCAACTTTACAATGAGCTGAACCTGGGTCCGAGAGAA
 GAGTACGACGTTTTTGGACAAACGCCGGGGCCGAGATCCTGAGATGGGGGGGAAGCC
 GAGAAGGAAGAATCCTCAAGAAGGCCTGTACAACGAGCTTCAAAAAGACAAAATG
 GCTGAGGCGTACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGACGAGGCAAGGGTC
 ACGATGGCTTGTATCAGGGCCTGAGTACAGCCACAAAGGACACCTATGACGCCCTC
 CACATGCAGGCACTGCCCCACGCTAG (SEQ ID NO: 71)

[0282] Конструкция 8B5 CD8 AA (сигнальная последовательность выделена жирным шрифтом)

MALPVTALLPLALLHAARPQIQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFKNY
 GMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDYDGSNEYYGDPVKGRFTISRDNLSKNMLYLQMNSLRA
 DDTAVYYCARSGIAVAGAFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPDITL
 SLSPGEEKATLSCRASQSVSSSFLAWYQKPKGQAPSLLIYVASRRAAGIPDRFSGSGGTD
 FTLISRLEPEDFGMFCYQHYGRTPFTFGPGTKVDIKRAAALSNSIMYFSHFVPVFLPAKP
 TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCGVLLL
 SLVITLYCNHRNRSKRSLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSR
 SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ
 KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR (SEQ ID
 NO: 72)

[0283] Конструкция 4E9 CD28 ДНК (сигнальная последовательность выделена жирным шрифтом)

ATGGCACTCCCCGTAACCTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGC
ACGCCGCACGCCCGCAGGTGCAGCTGGTGCAGAGTGGGGCAGAAGTAAAGAAGC
 CTGGTGCCTCTGTCAAAGTTAGTTGCAAAGCATCTGGGTATACTTTCACCGGTTACT
 ATATCCATTGGGTTCCGGCAGGCCCCGGAGCAGGGACTGGAGTGGATGGGCTGGATC
 AACCCAAATTCAGGCGGCACTAACTATGCTCAAAAGTTCCAGGGCAGGGTCACAAT
 GGCCCCGGGATACTTCAATTAGCACCGTCTATATGGATCTTAGTCGGCTGCGCAGTGA
 CGATAACCGCTGTCTACTATTGCGCAAGGATCAGGGGGCGGCAATTCTGTTTTTACTA
 TTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACCGTCTCCTCTGGTGGAGGCGGTAGTGGTGGAG
 GCGGGTCCGGAGGAGGGGGCTCCGATATAGTGATGACTCAAAGTCCCGATAGCTTG
 GCAGTATCTCTGGGGAACGCGCCACTATTAACCTGTAAATCCACCCAGTCCATTCTC

TATACCTCTAACAACAAGAATTTCTCGCGTGGTATCAGCAAAAACCCGGGCAGCC
 ACCTAAACTGCTTATATCCTGGGCCAGCATCAGGGAGTCCGGCGTCCCTGATCGGT
 CAGCGGTAGTGGCAGCGGGACAGACTTCGCTCTGACCATCAGTAGCCTCCAGGCTG
 AAGATGTCGCAGTGTATTATTGCCAGCAGTACTTCAGCACGATGTTTAGCTTCGGGC
 AGGGAACCAAGCTGGAATAAAGAGAGCTGCAGCAATCGAGGTGATGTACCCACCT
 CCATATCTGGACAATGAAAAGTCCAATGGCACTATCATAACAGTGAAGGGCAAACA
 CCTGTGTCCATCTCCACTTTTCCCGGGCCCGTCTAAACCTTTCTGGGTGCTGGTGGT
 GTGGGCGGAGTTCTGGCCTGTTATTCAGTCTGGTCACCGTGGCTTTCATCATTTTTT
 GGGTAAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCA
 CGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTC
 GCTGCCTATCGGAGCCGAGTGAAATTTTCTAGATCAGCTGATGCTCCCGCCTATCAG
 CAGGGACAGAATCAACTTTACAATGAGCTGAACCTGGGTTCGCAGAGAAGAGTACGA
 CGTTTTGGACAAACGCCGGGGCCGAGATCCTGAGATGGGGGGGAAGCCGAGAAGG
 AAGAATCCTCAAGAAGGCCTGTACAACGAGCTTCAAAAAGACAAAATGGCTGAGGC
 GTACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGACGAGGCAAGGGTCACGATGGCT
 TGTATCAGGGCCTGAGTACAGCCACAAAGGACACCTATGACGCCCTCCACATGCAG
 GCACTGCCCCACGCTAG (SEQ ID NO: 73)

[0284] Конструкция 4Е9 CD28 АА (сигнальная последовательность выделена жирным шрифтом)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTG
YYIHWVRQAPEQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMARDTSISTVYMDLSRLRS
DDTAVYYCARIRGGNSVFDYWQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSL
AVSLGERATINCKSTQSILYTSNNKNFLAWYQQKPGQPPKLLISWASIREGVPDRFSGS
GSRTDFALTISSLQAEDVAVYYCQQYFSTMFSGGQGTKLEIKRAAAIEVMYPPPYLDNE
KSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRL
LHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE
LNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER
RRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 74)

[0285] Конструкция 4Е9 CD28Т ДНК (сигнальная последовательность выделена жирным шрифтом)

ATGGCACTCCCCGTAACCTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGC
ACGCCGCACGCCCGCAGGTACAGCTGGTGCAGAGCGGGGCCGAGGTCAAAAAGCC
CGGGGCTTCAGTTAAGGTAGCTGCAAGGCTTCCGGCTACACCTTTACCGGTTACTA
TATTCAGTGGGTTAGACAGGCACCTGAGCAAGGACTGGAGTGGATGGGGTGGATTA
ACCCCAATAGCGGTGGGACCAACTACGCCAGAAGTTTCAAGGCCGAGTGACAATG
GCACGAGACACCTCCATTTCCACTGTGTACATGGACTTGAGCCGCCTCAGGTCAGAC
GACACCGCAGTGTACTACTGTGCGCGAATCCGCGGGCGGAAACAGCGTGTTTGACTA
CTGGGGTCAGGGCACGTTGGTGACCGTGTCTTCCGGAGGGGGGGGATCTGGTGGCG
GGGGCTCCGGCGGAGGCGGTAGTGATATTGTGATGACTCAGTCACCGGACAGTCTT
GCTGTTTCACTTGGTGAGAGGGCCACCATAAATTGTAAAAGCACCCAGAGCATTCTC

TACACATCTAACAAACAAAAATTTCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGACAGCC
 ACCCAAATTGCTGATTAGCTGGGCCAGCATTCGAGAATCTGGGGTTCCGGACCGCTT
 TTCCGGGTCTGGCTCTGGGACCGACTTCGCTTTGACCATAAGCTCTCTTCAGGCCGA
 AGACGTTCGCAGTATACTATTGTCAACAGTATTTTTCTACCATGTTTTCTTCGGCCAG
 GGAACATAAGTTGGAGATCAAGAGAGCAGCTGCATTGGATAATGAGAAGTCCAATGG
 CACTATTATCCACGTGAAAGGTAAACACCTGTGTCCCTCACCCCTGTTTTCCAGGACC
 TAGTAAACCATTCTGGGTCTTGGTTGTAGTCGGGGGCGTTTTGGCATGTTATTCCTT
 CTTGTGACAGTCGCCTTTATCATTCTGGGTGAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTC
 CATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTA
 CCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCCGAGTGAAATTTTC
 TAGATCAGCTGATGCTCCCGCCTATCAGCAGGGACAGAATCAACTTTACAATGAGCT
 GAACCTGGGTCGCAGAGAAGAGTACGACGTTTTGGACAAACGCCGGGGCCGAGATC
 CTGAGATGGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAATCCTCAAGAAGGCCTGTACAACGA
 GCTTCAAAAAGACAAAATGGCTGAGGCGTACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAGC
 GGAGACGAGGCAAGGGTCACGATGGCTTGTATCAGGGCCTGAGTACAGCCACAAAG
 GACACCTATGACGCCCTCCACATGCAGGCACTGCCCCACGCTAG (SEQ ID NO: 75)

[0286] Конструкция 4Е9 CD28Т АА (сигнальная последовательность выделена жирным шрифтом)

**MALPVTALLLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTG
 YYIHWVRQAPEQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMARDTSISTVYMDLSRLRS
 DDTAVYYCARIRGNSVFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSL
 AVSLGERATINCKSTQSILYTSNNKNFLAWYQQKPGQPPKLLISWASIRESGVPDRFSGS
 GSGTDFALTISSLQAEDVAVYYCQQYFSTMFSGGQGTKLEIKRAAALDNEKSNGTIIHK
 GKHLCPSPFPGPSKPFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMT
 PRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD
 VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDL
 YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 76)**

[0287] Конструкция 4Е9 CD8 ДНК (сигнальная последовательность выделена жирным шрифтом)

**ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGC
 ACGCCGCACGCCCGCAAGTTCAGCTTGTGCAGAGCGGAGCTGAGGTGAAAAAACC
 AGGCGCCTCCGTTAAGGTGTCTTGCAAAGCCAGCGGATACACATTTACCGGGTACTA
 TATCACTGGGTGAGGCAGGCCCTGAACAGGGCCTTGAATGGATGGGGTGGATCA
 ATCCAAATTCCGGGGGAACCAATTATGCTCAGAAATTTAGGGCAGAGTGACAATG
 GCCAGGGACACCTCAATCAGCACAGTCTACATGGACCTGAGCCGCCTGAGGTCTGA
 TGACACAGCCGTCTACTACTGTGCCCGGATCAGAGGGGGAAACAGTGTCTTCGACT
 ATTGGGGGCAGGGAACCCTGGTGACTGTCTCCTCCGGGGGAGGGGGTAGCGGGGGA
 GGCGGCAGCGCGGGGGTGGTTCTGACATTGTTATGACCCAATCCCAGACTCTCTG
 GCCGTGAGCCTGGGTGAGAGAGCCACCATCAATTGCAAGTCCACCCAGAGCATACT
 CTATACGTCAAACAATAAGAATTTCTGGCGTGGTATCAGCAAAGCCGGGTCAAC**

CACCCAAGTTGTTGATTAGCTGGGCATCAATTCGAGAATCTGGCGTCCCTGATAGGT
 TTAGCGGGAGCGGTAGTGGAACCGACTTTGCGCTGACCATTTTCATCCCTTCAGGCAG
 AGGACGTGGCTGTGTATTACTGTCAACAGTACTTCAGCACGATGTTTTCTTTTCGGCC
 AGGGGACGAAGCTGGAGATAAAGCGGGCCGCAGCACTCAGCAACAGCATCATGTA
 CTTTTCTCATTTTCGTCCCAGTTTTTCTCCCCGCCAAACCCACCACTACCCCTGCTCCT
 AGGCCTCCCCTCCCGCACCCACCATTGCTTCCCAACCTCTGTCATTGAGGCCCGAA
 GCCTGCAGACCTGCCGCAGGAGGGGCTGTGCACACCCGCGGTCTGGATTTTGCTTGT
 GATATCTACATTTGGGCCCTTTGGCCGGAACCTGCGGAGTGTGTTGCTGAGCCTT
 GTTATCACGTTGTACTGTAATCACAGAAACAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCAT
 AGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCA
 GCCTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCCGAGTGAAATTTTCTAG
 ATCAGCTGATGCTCCCGCCTATCAGCAGGGACAGAATCAACTTTACAATGAGCTGA
 ACCTGGGTTCGCAGAGAAGAGTACGACGTTTTGGACAAACGCCGGGGCCGAGATCCT
 GAGATGGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAATCCTCAAGAAGGCCTGTACAACGAGC
 TTCAAAAAGACAAAATGGCTGAGGCGTACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGG
 AGACGAGGCAAGGGTCACGATGGCTTGTATCAGGGCCTGAGTACAGCCACAAAGGA
 CACCTATGACGCCCTCCACATGCAGGCACTGCCCCACGCTAG (SEQ ID NO: 77)

[0288] Конструкция 4E9 CD8 AA (сигнальная последовательность выделена жирным шрифтом)

**MALPVTALLLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTG
 YYIHWVRQAPEQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMARDTSISTVYMDLSRLRS
 DDTAVYYCARIRGGNSVFDYWQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSL
 AVSLGERATINCKSTQSILYTSNNKNFLAWYQQKPGQPPKLLISWASIRESGVPDRFSGS
 GSGTDFALTISSLQAEDVAVYYCQQYFSTMFSGGQGTKLEIKRAAALSNSIMYFSHFVPV
 FLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGT
 CGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
 RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
 LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
 (SEQ ID NO: 78)**

[0289] Конструкция 11F11 CD28 ДНК (сигнальная последовательность выделена жирным шрифтом)

**ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGC
 ACGCCGCACGCCCGCAGGTGCAGCTCCAAGAGTCAGGACCAGGACTTGTCAAACC
 AAGCCAGACCCTCAGCCTTACCTGCACCGTCAGCGGGGGCTCCATCAGCTCTGGGGC
 TТАCTACTGGACATGGATACGACAGCATCCCGGTAAGGTCTGGAGTGGATCGGGT
 ACATACACTATAGTGGTTCCACATATTCTAATCCATCTCTTAAGAGTCGAATTACAA
 TTTCACTCGATACTTCAAAGAATCAGTTCAGCTTGAAGTGAAGTCCGTGACCGCGG
 CTGACACCGCCGTGТАCTACTGTGCACGCCAAGAGGATTATGGCGGACTGTTCGATT
 ATTGGGGGCAGGGAAGTCTCGTGACAGTGAGCTCCGGCGGGGGCGGCAGCGGTGGG
 GGTGGAAGTGGTGGAGGGGGCAGCGAGATCGTGATGACCCAGAGTCCTGCCCACT**

GTCAGTGAGTCCTGGGGAGCGAATCACACTTTCCTGTTCGAGCGTCTCAGTCCGTGAC
CACGGACCTGGCGTGGTACCAGCAGATGCCAGGCCAGGCGCCAAGACTCCTGATCT
ACGACGCTTCTACCCGCGCTACTGGTTTCCCCGCCAGATTCTCCGGAAGCGGGTCCG
GGACGGATTTTACACTTACCATCTCTTCATTGCAGGCTGAGGATTTTGCCGTGTACTA
CTGTCAGCATTACAAAACCTGGCCCCTCACTTTCGGGGGCGGAACAAAAGTGAAAA
TTAAACGGGCAGCAGCTATTGAGGTGATGTACCCACCCCCCTACCTGGACAACGAG
AAATCCAATGGCACCATCATCCACGTTAAGGGTAAGCACTTGTGTCCCTCACCCTC
TTCCCTGGGCCTAGCAAGCCATTCTGGGTCCTGGTGGTCGTGGGAGGCGTGCTGGCC
TGCTATTCCCTCCTGGTTACCGTTGCCTTTATCATATTTTGGGTCAGATCCAAAAGAA
GCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAA
GGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCCGA
GTGAAATTTTCTAGATCAGCTGATGCTCCCGCCTATCAGCAGGGACAGAATCAACTT
TACAATGAGCTGAACCTGGGTTCGAGAGAAGAGTACGACGTTTTTGGACAAACGCCG
GGCCGAGATCCTGAGATGGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAATCCTCAAGAAGGC
CTGTACAACGAGCTTCAAAAAGACAAAATGGCTGAGGCGTACTCTGAGATCGGCAT
GAAGGGCGAGCGGAGACGAGGCAAGGGTCACGATGGCTTGTATCAGGGCCTGAGT
ACAGCCACAAAGGACACCTATGACGCCCTCCACATGCAGGCACTGCCCCACGCTA
G (SEQ ID NO: 79)

[0290] Конструкция 11F11_CD28_AA (сигнальная последовательность выделена жирным шрифтом)

MALPVTALLLPLALLHAARPQVQLQESGPELVKPSQTLSTCTVSGGSISSGA
YYWTWIRQHPGKGLEWIGYIHYSGSTYSNPSLKSRLITSLDTSKNQFSLKLNNSVTAADTA
VYYCARQEDYGGFLFDYWGGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPG
ERITLSCRASQSVTTDLAWYQQMPGQAPRLLIYDASTRATGFPARFSGSGSGTDFTLTISS
LQAEDFAVYYCQHYKTWPLTFGGGTKVEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGK
HLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPR
RPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL
DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQ
GLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 80)

[0291] Конструкция 11F11_CD28T_ДНК (сигнальная последовательность выделена жирным шрифтом)

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGC
ACGCCGCACGCCCGCAGGTGCAGTTGCAGGAGAGCGGGCCAGGCCTGGTGAAGCC
CAGCCAAACACTGAGCCTCACCTGTACTGTGTCCGGTGGTAGCATTTCAGCGGGGC
GTATTATTGGACATGGATACGCCAACACCCTGAAAAGGGTTGGAGTGGATTGGAT
ACATCCATTATTCTGGGTCCACCTATAGTAACCCTTCTCTCAAGTCTCGCATTACTAT
TAGTTTGGATACCTCTAAGAATCAGTTTAGTCTGAAGCTGAACAGTGTAACCGCCGC
CGACACCGCGGTCTACTACTGTGCTAGGCAGGAGGATTACGGGGGACTGTTTCGATT
ACTGGGGCCAGGGGACATTGGTCACCGTTTCAAGCGGGGGCGGCGGATCTGGCGGA
GGGGGATCTGGAGGCGGAGGCTCTGAGATCGTAATGACTCAGAGCCCAGCCACCCT

GTCCGTCTCTCCCGGCGAACGCATCACTCTGAGCTGTAGGGCATCACAGTCTGTTAC
CACAGATCTGGCTTGGTATCAACAAATGCCTGGGCAGGCCCGCGACTGTTGATTTA
TGACGCCTCTACGCGGGCCACAGGATTTCTGCCCCGGTTCTCCGGGTCTGGTTCTGG
CACCGATTTTACCTTGACAATCAGTAGCTTGCAGGCAGAAGATTTTCGCTGTGTATTA
CTGCCAACATTATAAGACATGGCCTTTGACATTCGGCGGGGGAACCAAAGTGGAGA
TCAAACGCGCCGCGAGCCCTGGACAATGAGAAGTCTAATGGGACCATCATTACGTC
AAAGGGAAACACCTGTGCCCTCTCCTCTGTTCCCAGGCCCTTCTAAGCCCTTCTGG
GTTCTCGTGGTGGTGGGCGGTGTCCTGGCCTGCTATTCCCTTCTTGTGACAGTGGCCT
TTATCATTTTTTGGGTGAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGA
ATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCA
CCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCCGAGTGAAATTTTCTAGATCAGCTGATGCT
CCCGCCTATCAGCAGGGACAGAATCAACTTTACAATGAGCTGAACCTGGGTTCGCAG
AGAAGAGTACGACGTTTTGGACAAACGCCGGGGCCGAGATCCTGAGATGGGGGGG
AAGCCGAGAAGGAAGAATCCTCAAGAAGGCCTGTACAACGAGCTTCAAAAAGACA
AAATGGCTGAGGCGTACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGACGAGGCAA
GGGTCACGATGGCTTGTATCAGGGCCTGAGTACAGCCACAAAGGACACCTATGACG
CCCTCCACATGCAGGCACTGCCCCACGCTAG (SEQ ID NO: 81)

[0292] Конструкция 11F11 CD28T AA (сигнальная последовательность выделена жирным шрифтом)

MALPVTALLLPLALLHAARPQVQLQESGPELVKPSQTLSTCTVSGGSISSGA
YYWTWIRQHPGKGLEWIGYIHYSGSTYSNPSLKSRLITSLDTSKNQFSLKLNVSVAADTA
VYYCARQEDYGGFLDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPG
ERITLSCRASQSVTTDLAWYQQMPGQAPRLLIYDASTRATGFPARFSGSGSGTDFTLTISS
LQAEDFAVYYCQHYKTWPLTFGGGTKVEIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLP
GPSKPFWVLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKH
YQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP
EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT
YDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 82)

[0293] Конструкция 11F11 CD8 ДНК (сигнальная последовательность выделена жирным шрифтом)

ATGGCACTCCCCGTAACCTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGC
ACGCCGCACGCCCGCAGGTACAGTTGCAGGAAAGCGGCCCGGCCTTGTAACC
AAGCCAGACTCTCAGTTTGACTTGCACCGTCTCAGGAGGAAGCATTTCAGTGGGGC
TTATTATTGGACTTGGATTCGGCAGCATCCTGGGAAAGGGTTGGAATGGATCGGTTA
TATTCATTATAGCGGTAGCACCTATTCCAATCCGTCTTTGAAAAGCAGAATCACTAT
TTCACTCGACACCTCTAAGAACCAGTTCAGTCTCAAACCTGAACTCCGTGACAGCGGC
CGACACAGCTGTGTACTACTGTGCACGGCAAGAAGATTATGGGGGGCTGTTTCGATT
ATTGGGGCCAAGGCACACTGGTGACAGTATCAAGCGGTGGAGGAGGCTCCGGGGGC
GGAGGAAGTGGAGGCGGGGGGAGCGAAATTGTGATGACCCAGTCTCCAGCCACGCT
GTCAGTGTCTCCGGGAGAACGCATAACCCTCTCCTGCCGGGCCAGTCAGTCCGTCAC

GACCGATTTGGCTTGGTATCAACAGATGCCTGGGCAGGCCCGCTTGCTGATCTA
 TGACGCCTCCACCAGAGCAACTGGTTTCCCCGCCCGTTTCAGCGGATCTGGAAGCGG
 TACAGATTTTACTTACCATCTCATCATTGCAAGCTGAGGATTTTGCCGTGTACTAC
 TGCCAGCACTACAAGACCTGGCCTTTGACGTTTCGGCGGCGGAACAAAAGTGGAGAT
 TAAAAGAGCCGCTGCCCTCAGTAACTCAATCATGTACTTTAGTCACTTTGTGCCTGT
 GTTTCTGCCAGCAAAGCCAACAACCACACCAGCACCCCGCCCTCCAACGCCTGCCCC
 AACCATCGCCTCCCAGCCTCTGAGCTTGAGGCCTGAGGCTTGTCGCCAGCTGCTGG
 AGGTGCTGTGCATACAGGAGACTGGATTTTCGCCTGCGATATCTATATCTGGGCACC
 ACTTGCCGGTACTTGTGGTGTGTTGCTGCTCTCACTGGTCATCACGCTGTACTGTAAC
 CATAGGAATAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGAC
 TCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAG
 ATTTTCGCTGCCTATCGGAGCCGAGTGAAATTTTCTAGATCAGCTGATGCTCCCGCCT
 ATCAGCAGGGACAGAATCAACTTTACAATGAGCTGAACCTGGGTGCGAGAGAAGAG
 TACGACGTTTTGGACAAACGCCGGGGCCGAGATCCTGAGATGGGGGGGAAGCCGAG
 AAGGAAGAATCCTCAAGAAGGCCTGTACAACGAGCTTCAAAAAGACAAAATGGCTG
 AGGCGTACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGACGAGGCAAGGGTCACGA
 TGGCTTGTATCAGGGCCTGAGTACAGCCACAAAGGACACCTATGACGCCCTCCACAT
 GCAGGCACTGCCCCACGCTAG (SEQ ID NO: 83)

[0294] Конструкция 11F11 CD8 AA (сигнальная последовательность выделена жирным шрифтом)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLQESGPELVKPSQTLSTCTVSGGSISSGA
 YYWTWIRQHPGKGLEWIGYIHYSGSTYSNPSLKSRLITSLDTSKNQFSLKLNSTVAADTA
 VYYCARQEDYGGFLFDYWGGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPG
 ERITLSCRASQSVTTDLAWYQQMPGQAPRLLIYDASTRATGFPARFSGSGSGTDFTLTISS
 LQAEDFAVYYCQHYKTWPLTFGGGTKVEIKRAAALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPA
 PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCGVLLLSLVIT
 LYCNHRNRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADA
 PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK
 MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR (SEQ ID NO: 84)

[0295] Человеческая FLT3 NM_004119 AA

[0296]

MPALARDGGQLPLLVVFSAMIFGTITNQDLPVIKCVLINHKNNDSVVGKSSSYPMVSESP
 EDLGCALRPQSSGTVYEAAAVEVDVSASITLQVLVDAPGNISCLWVFKHSSLNCQPHFD
 LQNRGVVSMVILKMTETQAGEYLLFIQSEATNYTILFTVSIRNTLLYTLRRPYFRKMENQ
 DALVCISESVPEPIVEWVLCDSQGESCKEESPAVVKKEEKVLHELFGTDIRCCARNELGR
 ECTRLFTIDLNQTPQTTLPLFLKVGEPWIRCKAVHVNHGFLTWELNKALEEGNYF
 EMSTYSTNRTMIRILFAFVSSVARNDTGYTCSKHPQSALVTIVEKGFINATNSSEDY
 EIDQYEEFCFSVRFKAYPQIRCTWTFSRKSFPCQKGLDNGYSISKFCNHKHQPGEYIFHA
 ENDDAQFTKMFNLRKPKQVLAEASASQASCFSDGYPLPSWTWKKCSDKSPNCTEIT
 EGVWNRKANRKFVFGQWVSSSTLNMSEAIKGLVKCCAYNSLGTSCETILLNSPGPFPIQ

DNISFYATIGVCLLFIVVLTLICHKYKKQFRYESQLQMVQVTGSSDNEYFYVDFREY EY
DLKWEFPRENLEFGKVLGSGAFGKVMNATAYGISKTGVSIQVAVKMLKEKADSSEREA
LMSELKMMTQLGSHENIVNLLGACTLSGPIYLIFEYCCYGDLLNYLRKREKFHRTWTEI
FKEHNFSFYPTFQSHPNSSMPGSREVQIHPDSQISGLHGNSFHSEDEIEYENQKRLEEEE
DLNVLTFEDLLCFAYQVAKGMEFLEFKSCVHRDLAARNVLVTHGKVVKICDFGLARDI
MSDSNYVVRGNARLPVKWMAPESLFEGIYTIKSDVWSYGILLWEIFSLGVNPPYGPVD
ANFYKLIQNGFKMDQPFYATEEIIYIIMQSCWAFDSRKRPSFPNLTSFLGCQLADAEEM
YQNV DGRVSECPHTYQNR RPF SREMDLGLLSPQAQVEDS (SEQ ID NO: 85)

[0297] ДНК с сигнальным пептидом CAR

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGC
CGCACGCCCG (SEQ ID NO: 86)

[0298] Сигнальный пептид CAR: MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 87)

[0299] scFv G4S-линкерная ДНК

GGCGGTGGAGGCTCCGGAGGGGGGGGCTCTGGCGGAGGGGGCTCC (SEQ ID
NO: 88)

[0300] scFv G4s линкер: GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 89)

[0301] Линкер scFv Whitlow ДНК

GGGTCTACATCCGGCTCCGGGAAGCCCGGAAGTGGCGAAGGTAGTACAAAG
GGG (SEQ ID NO: 90)

[0302] Линкер scFv Whitlow: GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 91)

[0303] 4-1BB последовательность нуклеиновой кислоты (внутриклеточный домен)

AAGCGCGGCAGGAAGAAGCTCCTCTACATTTTAAAGCAGCCTTTTATGAGGC
CCGTACAGACAACACAGGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCAGATTTCCCGAGGAGGAG
GAAGGTGGGTGCGAGCTG (SEQ ID NO: 92)

[0304] 4-1BB AA (внутриклеточный домен)

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 93)

[0305] OX40 AA

RRDQRLPPDANKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI (SEQ ID NO: 94)

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[0306] 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

[0307] 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.

[0308] Следующие примеры, в том числе проведенные эксперименты достигнутые результаты, представлены в исключительно в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения настоящего изобретения.

ПРИМЕР 1

[0309] 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 минут при 4°C. Затем клетки промывали и повторно суспендировали в окрашенном буфере с пропидиум йодидом (BD Pharmingen) перед накоплением данных. Экспрессия FLT3 на клетки-мишени показано на фиг. 1.

ПРИМЕР 2

[0310] Плазмиды, кодирующие промотор T7, конструкцию CAR и стабилизирующую бета-глобин последовательность линеаризовали путем ферментации 10 мкг ДНК с EcoRI и BamHI (NEB) в течение ночи. Затем ДНК ферментировали в течение 2 часов 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 mMESSAGE 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 (Nemascare) 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 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 часов. Для оценки экспрессии CAR Т-клетки окрашивали с помощью FLT-3-HIS (Sino Biological Inc.) или биотинилированного белка L (Thermo Scientific) в окрашенном буфере (BD Pharmingen) в течение 30 минут 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 минут при 4°C. Затем клетки промывали и повторно сусупендировали в окрашенном буфере с помощью пропидиум йодида (BD Pharmingen) перед накоплением данных. Экспрессия FLT3 CAR в электропорированных Т-клетках показана на фиг. 2.

ПРИМЕР 3

[0311] 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 часов после совместного культивирования надосадочные жидкости анализировали посредством Luminex (EMD Millipore) и жизнеспособность клеток-мишеней оценивали посредством проточного цитометрического анализа поглощения пропидиум йодида (PI) CD3-отрицательными клетками. Цитолитическая активность электропорированных CAR Т-клеток показана на фиг. 3, а образование цитокинов показано на фиг. 4.

ПРИМЕР 4

[0312] 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 минут при комнатной температуре. Одновременно, 293 Т-клеток (ATCC) трипсинизировали, подсчитывали и всего 10×10^6 клеток высевали в сосуд T75 вместе с преобразующей смесью. Через 3 дня после преобразования надосадочные жидкости собирали и фильтровали через 0,45 мкм фильтр, и хранили при -80°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 часов 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 FLT-3-HIS (Sino Biological Inc.) или биотинилированного белка L (Thermo Scientific) в окрашенном буфере (BD Pharmingen) в течение 30 минут 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 минут при 4°C. Затем клетки промывали и повторно сусупендировали 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

[0313] 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 часов после совместного культивирования надосадочные жидкости анализировали посредством Luminex (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

[0314] 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

[0315] Для оценки активности против лейкоза *in vivo* FLT3 CAR Т-клетки генерировали для применения в ксеногенной модели AML человека. Экспрессия CAR различных эффекторных линий, применяемая в ксеногенной модели AML человека, показана на фиг. 9. Меченные люциферазой клетки MV4;11 (2×10^6 /животное) внутривенно вводили самкам мышей NSG 5-6-недельного возраста. Через 6 дней 6×10^6 Т-клеток (~50% CAR+) в 200 мкл PBS вводили внутривенно и опухолевую нагрузку животных измеряли еженедельно с использованием биолюминесцентной визуализации. Как показано на фиг. 10, инъекция экспрессирующих 10E3-CD28T и 8B5-CD28T 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-CD28T или 8B5-CD28T CAR Т-клеток обеспечивала значительное преимущество выживаемости среди животных, которые получали преобразованные с помощью Mock клетки или CAR Т-клетки, экспрессирующие конструкции 10E3-CD28 или 10E3-CD8. Значительных отличий между конструкциями 10E3-CD28T и 8B5-CD28T с точки зрения эффективности не наблюдали.

В частных вариантах осуществления настоящее изобретение может относиться к следующим вариантам:

Вариант 1. Химерный антигенный рецептор, включающий антигенсвязывающую молекулу, которая специфично связывается с FLT3, при этом антигенсвязывающая молекула содержит:

вариабельную область CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая отличается не более чем на 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков от последовательности в SEQ ID NO: 17; или

вариабельную область CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая отличается не более чем на 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков от последовательности SEQ ID NO:18 или SEQ ID NO:26; или

вариабельную область CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая отличается не более чем на 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков от последовательности в SEQ ID NO SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO:27; или

вариабельную область CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая отличается не более чем на 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков от последовательности SEQ ID NO:22 или SEQ ID NO:30; или

вариабельную область CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая отличается не более чем на 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков от последовательности SEQ ID NO:23 или 31; или

вариабельную область CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая отличается не более чем на 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков от последовательности SEQ ID NO:24 или SEQ ID NO:32; или

вариабельную область CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность последовательности вариабельной области CDR1 тяжелой цепи клона 10E3, клона 2E7, клона 8B5, клона 4E9 или клона 11F11; или

вариабельную область CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность последовательности вариабельной области CDR2 тяжелой цепи клона 10E3, клона 2E7, клона 8B5, клона 4E9 или клона 11F11; или

вариабельную область CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность последовательности вариабельной области CDR3 тяжелой цепи клона 10E3, клона 2E7, клона 8B5, клона 4E9 или клона 11F11; или

вариабельную область CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность последовательности вариабельной области CDR1 легкой цепи клона 10E3, клона 2E7, клона 8B5, клона 4E9 или клона 11F11; или

вариабельную область CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность последовательности вариабельной области CDR2 легкой цепи клона 10E3, клона 2E7, клона 8B5, клона 4E9 или клона 11F11; или

вариабельную область CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность последовательности вариабельной области CDR3 легкой цепи клона 10E3, клона 2E7, клона 8B5, клона 4E9 или клона 11F11; или

последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая отличается не более чем на 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 остатков от последовательности вариабельной области тяжелой цепи клона 10E3, клона 2E7, клона 8B5, клона 4E9 или клона 11F11; или

последовательность вариабельной области легкой цепи, которая отличается не более чем на 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 остатков от последовательности вариабельной области легкой цепи клона 10E3, клона 2E7, клона 8B5, клона 4E9 или клона 11F11.

Вариант 2. Химерный антигенный рецептор по п. 1, дополнительно включающий в себя по меньшей мере один костимулирующий домен.

Вариант 3. Химерный антигенный рецептор по п. 1, дополнительно включающий в себя по меньшей мере один активирующий домен.

Вариант 4. Химерный антигенный рецептор по п. 2, 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, CD11a/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 1, 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, 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, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, лиганд, который специфично связывается с CD83, или любую их комбинацию.

Вариант 5. Химерный антигенный рецептор по п. 4, где костимулирующий домен включает CD28.

Вариант 6. Химерный антигенный рецептор по п. 5, где костимулирующий домен CD28 включает последовательность, которая отличается не более чем на 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков от последовательности в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, или SEQ ID NO: 8.

Вариант 7. Химерный антигенный рецептор по п. 3, где костимулирующий домен CD8 включает последовательность, которая отличается не более чем на 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков от последовательности в SEQ ID NO: 14.

Вариант 8. Химерный антигенный рецептор по п. 3, где активирующий домен включает CD3.

Вариант 9. Химерный антигенный рецептор по п. 7 где CD3 содержит CD3 дзета.

Вариант 10. Химерный антигенный рецептор по п. 8, где CD3 дзета включает последовательность, которая отличается не более чем на 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков от последовательности в SEQ ID NO: 10.

Вариант 11. Химерный антигенный рецептор по п. 1, где костимулирующий домен включает последовательность, которая отличается не более чем на 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков 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, 1 или 0 аминокислотных остатков от последовательности в SEQ ID NO: 10.

Вариант 12. Полинуклеотид, кодирующий химерный антигенный рецептор по п. 1.

Вариант 13. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 12.

Вариант 14. Вектор по п. 13, который представляет собой ретровирусный вектор, вектор ДНК, плазмиду, вектор РНК, аденовирусный вектор, связанный с аденовирусом вектор, лентивирусный вектор или любую их комбинацию.

Вариант 15. Иммунная клетка, содержащая вектор по п. 13.

Вариант 16. Иммунная клетка по п. 15, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку, проникающий в опухоль лимфоцит (TIL), NK-клетку, TCR-экспрессирующую клетку, дендритную клетку или NK-Т-клетку.

Вариант 17. Иммунная клетка по п. 16, где клетка представляет собой аутологичную Т-клетку.

Вариант 18. Иммунная клетка по п. 16, где клетка представляет собой аллогенную Т-клетку.

Вариант 19. Иммунная клетка по п. 15, где вектор вводят в клетку, которая выделена из организма пациента или которая выращена из образца, взятого из организма пациента.

Вариант 20. Иммунная клетка по п. 15, где вектор вводят в клетку, которая выделена из организма донора или которая выращена из образца, взятого из организма пациента.

Вариант 21. Фармацевтическая композиция, содержащая иммунную клетку по п. 15.

Вариант 22. Химерный антигенный рецептор, включающий следующее:

(а) область VH клона 10E3 и область VL клона 10E3;

(b) область VH клона 2E7 и область VL клона 2E7;

(c) область VH клона 8B5 и область VL клона 8B5;

(d) область VH клона 4E9 и область VL клона 4E9;

(e) область VH клона 11F11 и область VL клона 11F11,

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

Вариант 23. Химерный антигенный рецептор по п. 22, где линкер представляет собой линкер scFv G4S или линкер scFv Whitlow.

Вариант 24. Химерный антигенный рецептор по п. 22, дополнительно включающий костимулирующий домен.

Вариант 25. Химерный антигенный рецептор по п. 22, дополнительно включающий активирующий домен.

Вариант 26. Химерный антигенный рецептор по п. 24, 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, CD11a/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 1, TNF рецепторные белки, белок иммуноглобулин, рецептор к цитокинам, интегрины, 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, 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, лиганд, который специфично связывается с CD83, или любую их комбинацию.

Вариант 27. Иммунная клетка, содержащая химерный антигенный рецептор по п. 22.

Вариант 28. Иммунная клетка по п. 27, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку, проникающий в опухоль лимфоцит (TIL), NK-клетку, TCR-экспрессирующую клетку, дендритную клетку или NK-Т-клетку.

Вариант 29. Т-клетка по п. 28, которая представляет собой аутологичную Т-клетку.

Вариант 30. Т-клетка по п. 29, которая представляет собой аллогенную Т-клетку.

Вариант 31. Фармацевтическая композиция, содержащая клетку по п. 27.

Вариант 32. Выделенный полинуклеотид, включающий последовательность, кодирующую химерный антигенный рецептор по п. 22.

Вариант 33. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 32.

Вариант 34. Иммунная клетка, содержащая вектор по п. 33.

Вариант 35. Иммунная клетка по п. 34, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку, проникающий в опухоль лимфоцит (TIL), NK-клетку, TCR-экспрессирующую клетку, дендритную клетку или NK-Т-клетку.

Вариант 36. Т-клетка по п. 35, которая представляет собой аутологичную Т-клетку.

Вариант 37. Т-клетка по п. 35, которая представляет собой аллогенную Т-клетку.

Вариант 38. Выделенный полипептид, содержащий аминокислотную последовательность конструкции 10E3 CD28, конструкции 10E3 CD28Т, конструкции 10E3 CD8, конструкции 2E7 CD28, конструкции 2E7 CD28Т, конструкции 2E7 CD8,

конструкции 8B5 CD28, конструкции 8B5 CD28T, конструкции 8B5 CD8, конструкции 4E9 CD28, конструкции 4E9 CD28T, конструкции 4E9 CD8, конструкции 11F11 CD28, конструкции 11F11 CD28T, или конструкции 11F11 CD8.

Вариант 39. Вектор, кодирующий полипептид по п. 38.

Вариант 40. Иммунная клетка, содержащая полипептид по п. 38.

Вариант 41. Иммунная клетка по п. 40, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку, проникающий в опухоль лимфоцит (TIL), НК-клетку, TCR-экспрессирующую клетку, дендритную клетку или НК-Т-клетку.

Вариант 42. Т-клетка по п. 41, которая представляет собой аутологичную Т-клетку.

Вариант 43. Т-клетка по п. 41, которая представляет собой аллогенную Т-клетку.

Вариант 44. Выделенный полинуклеотид, кодирующий химерный антигенный рецептор (CAR) или рецептор Т-клеток (TCR), содержащий антигенсвязывающую молекулу, которая специфично связывается с FLT3, где антигенсвязывающая молекула содержит переменную область CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность переменной области CDR3 тяжелой цепи клона 10E3, клона 2E7, клона 8B5.

Вариант 45. Полинуклеотид по п. 44 дополнительно включающий активирующий домен.

Вариант 46. Полинуклеотид по п. 45, где активирующий домен представляет собой CD3.

Вариант 47. Полинуклеотид по п. 46, где CD3 представляет собой CD3 дзета.

Вариант 48. Полинуклеотид по п. 47, где CD3 дзета содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9.

Вариант 49. Полинуклеотид по п. 44 дополнительно включающий костимулирующий домен.

Вариант 50. Полинуклеотид по п. 49, 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 MHC класса 1, TNF рецепторные белки, белок иммуноглобулин, рецептор к цитокинам, интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM), активирующие рецепторы НК-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, 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, лиганд, который специфично связывается с CD83, или любую их комбинацию.

Вариант 51. Полинуклеотид по п. 50, где костимулирующий домен CD28 кодирует аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO 2.

Вариант 52. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 41.

Вариант 53. Иммунная клетка, содержащая вектор по п. 49.

Вариант 54. Иммунная клетка по п. 50, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку, проникающий в опухоль лимфоцит (TIL), НК-клетку, TCR-экспрессирующую клетку, дендритную клетку или НК-Т-клетку.

Вариант 55. Т-клетка по п. 51, которая представляет собой аутологичную Т-клетку.

Вариант 56. Т-клетка по п. 51, которая представляет собой аллогенную Т-клетку.

Вариант 57. Выделенный полинуклеотид, кодирующий химерный антигенный рецептор (CAR) или рецептор Т-клеток (TCR), где указанные CAR или TCR содержат антигенсвязывающую молекулу, которая специфично связывается с FLT3, при этом антигенсвязывающая молекула включает следующее:

последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая отличается не более чем на 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 остатков от последовательности вариабельной области тяжелой цепи клона 10E3, клона 2E7, клона 8B5, клона 4E9 или клона 11F11; и/или

последовательность вариабельной области легкой цепи, которая отличается не более чем на 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 остатков от последовательности вариабельной области легкой цепи клона 10E3, клона 2E7, клона 8B5, клона 4E9 или клона 11F11.

Вариант 58. Полинуклеотид по п. 54 дополнительно включающий активирующий домен.

Вариант 59. Полинуклеотид по п. 55, где активирующий домен представляет собой CD3.

Вариант 60. Полинуклеотид по п. 56, где CD3 представляет собой CD3 дзета.

Вариант 61. Полинуклеотид по п. 60, где CD3 дзета содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9.

Вариант 62. Полинуклеотид по п. 57 дополнительно включающий костимулирующий домен.

Вариант 63. Полинуклеотид по п. 62, 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 1, TNF рецепторные белки, белок иммуноглобулин, рецептор к цитокинам, интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM), активирующие рецепторы НК-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, 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, лиганд, который специфично связывается с CD83, или любую их комбинацию.

Вариант 64. Полинуклеотид по п. 63, где костимулирующий домен CD28 содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO 3.

Вариант 65. Полинуклеотид по п. 64, где костимулирующий домен CD28 содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO 1.

Вариант 66. Выделенный полинуклеотид, кодирующий химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR), содержащий 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).

Вариант 67. Выделенный полинуклеотид, кодирующий химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR), содержащий 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).

Вариант 68. Способ лечения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту полинуклеотида по п. 12, 44, 57, 66 или 67.

Вариант 69. Способ лечения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту полипептида по п. 38.

Вариант 70. Способ лечения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту химерного антигенного рецептора по п. 1 или п. 22.

Вариант 71. Способ лечения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту клетки по п. 15, 27, 34, 40 или 53.

Вариант 72. Способ лечения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п. 21 или п. 31.

Вариант 73. Способ по любому из пп. 68, 69, 70, 71 или 72, где заболевание или нарушение представляет собой рак.

Вариант 74. Способ по п. 73, где рак представляет собой лейкоз, лимфому или миелому.

Вариант 75. Способ по п. 73, где рак представляет собой AML (острый миелоидный лейкоз).

Вариант 76. Способ по любому из пп. 68, 69, 70, 71 или 72, где заболевание или нарушение представляет собой по меньшей мере одно из следующего: острый миелоидный лейкоз (AML), хронический миелогенный лейкоз (СМL), хронический миеломоноцитарный лейкоз (СММL), 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.

Вариант 77. Способ по п. 76, 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 раздраженного кишечника), фибромиалгия, мастоцитоз и глютенная энтеропатия.

Вариант 78. Lentivirusный вектор по п. 14, где lentivirusный вектор представляет собой вектор pGAR.

ИЗМЕНЕННАЯ 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:97, SEQ ID NO:35 и SEQ ID NO:36, соответственно, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR 1, 2 и 3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39 и SEQ ID NO:40, соответственно; или

область VH с последовательностью SEQ ID NO:43 и область VL с последовательностью SEQ ID NO:41;

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, CD11a/CD18), CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig альфа (CD79a), DAP-10, Fc гамма рецептор, молекулу MHC класса I, TNF рецепторные белки, белок иммуноглобулин, рецептор к цитокинам, интегрины, 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, 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 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.

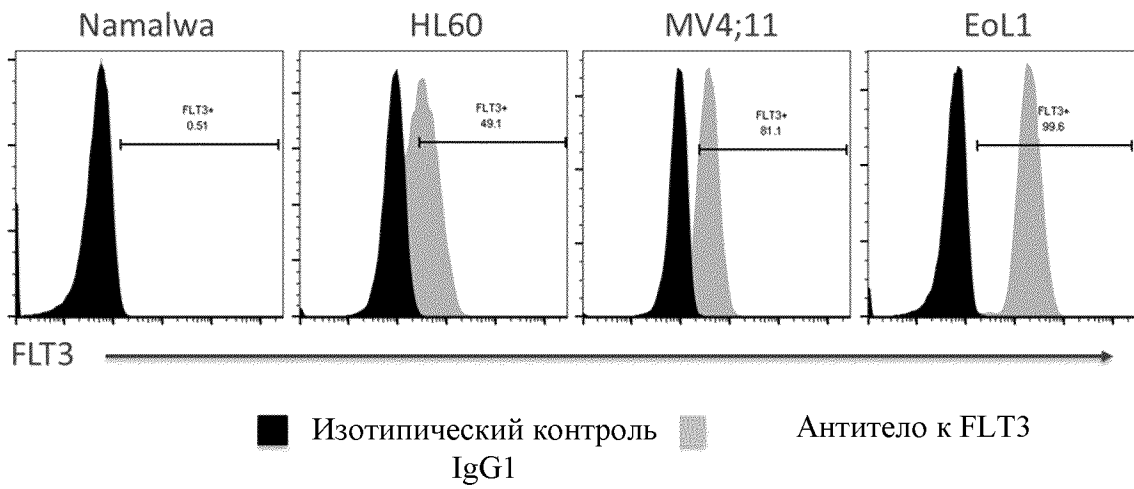
12. Иммунная клетка по п. 8, где вектор экспрессии введен в клетку, которая выделена из организма пациента или организма донора или которая выращена из образца, взятого из организма пациента или организма донора.

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

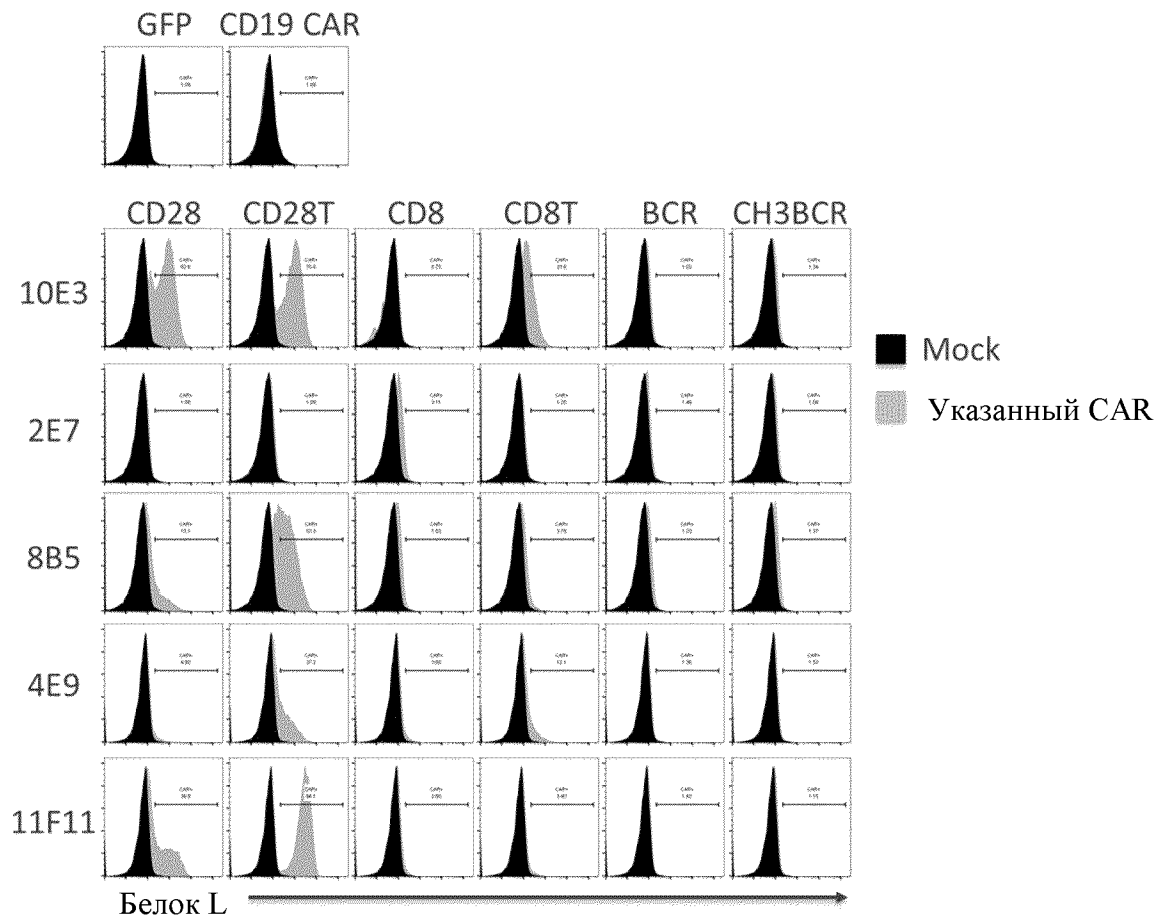
14. Способ лечения связанного с FLT3 заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту химерного антигенного рецептора по любому из пп. 1-5, или введение субъекту клетки по любому из пп. 8-12, или введение субъекту фармацевтической композиции по п. 13.

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 (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.
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 глютенная энтеропатия.

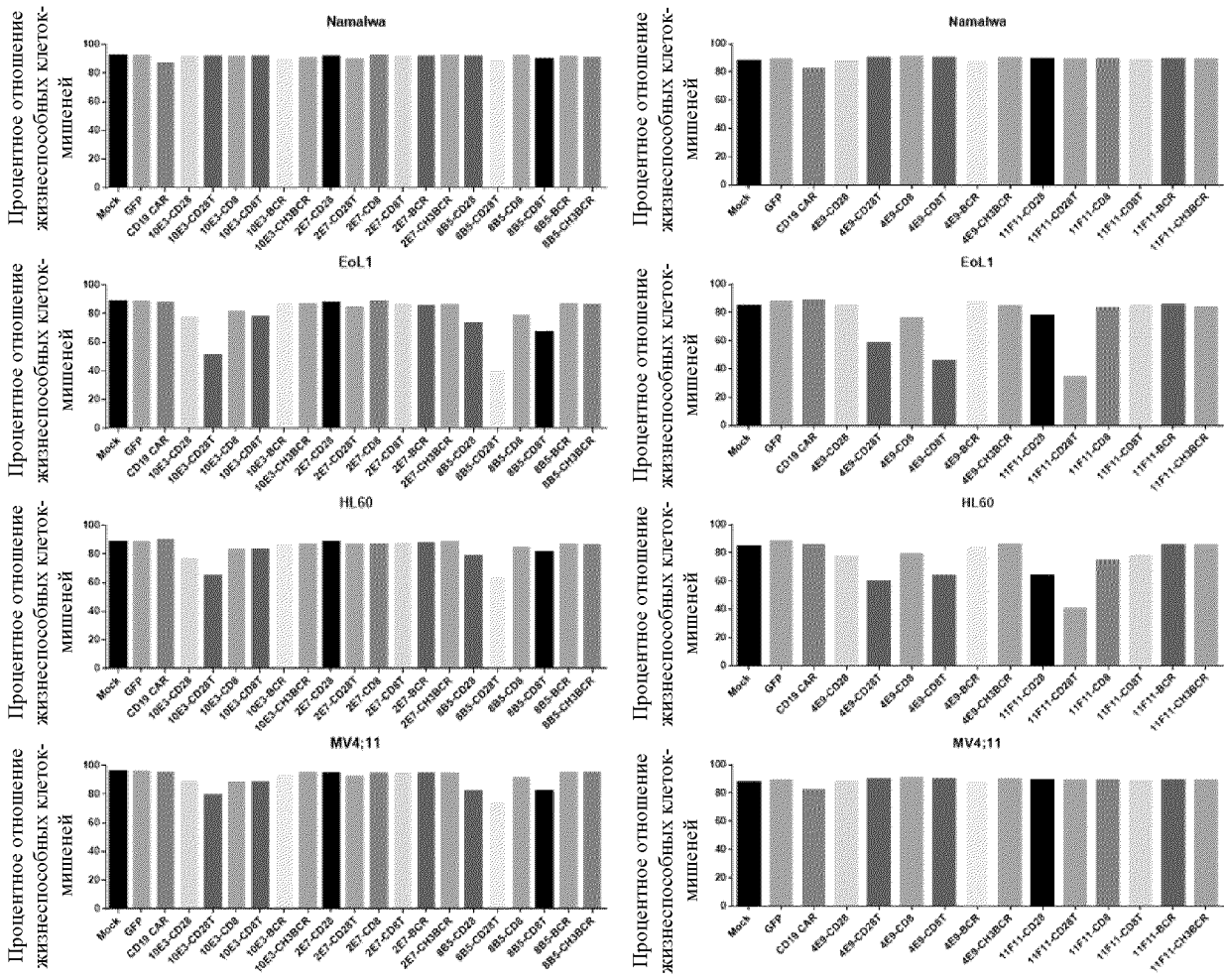
Фиг. 1



Фиг. 2

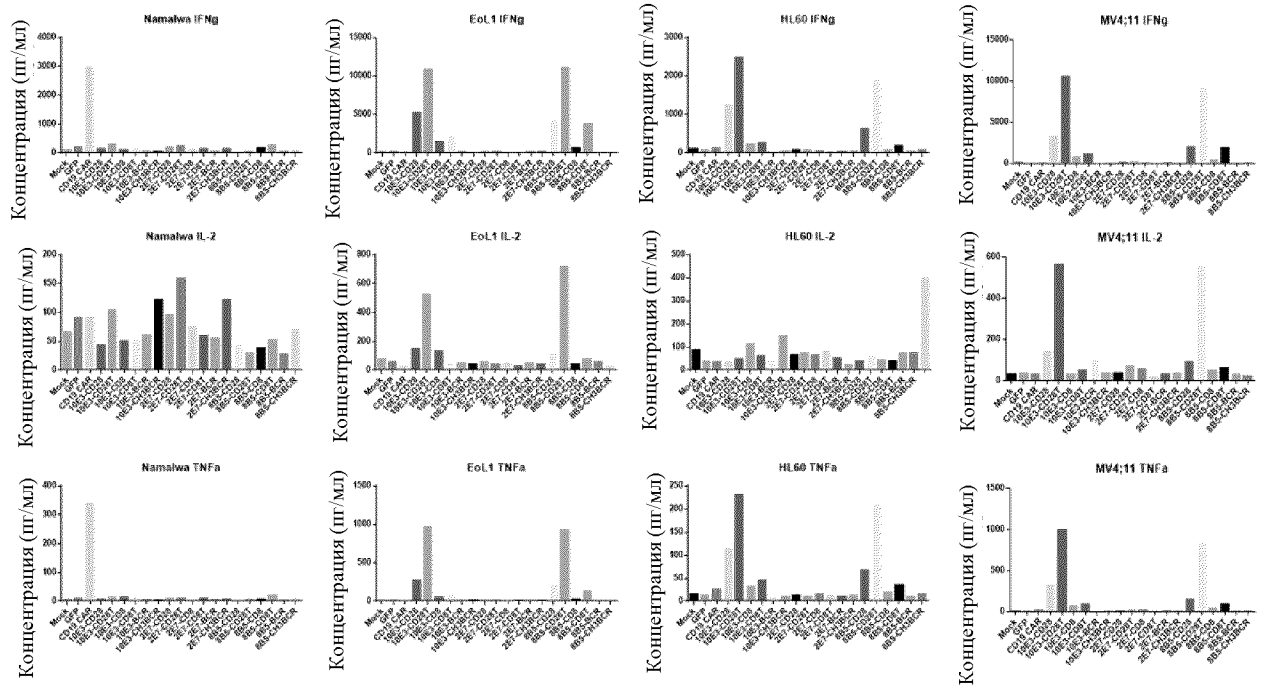


Фиг. 3

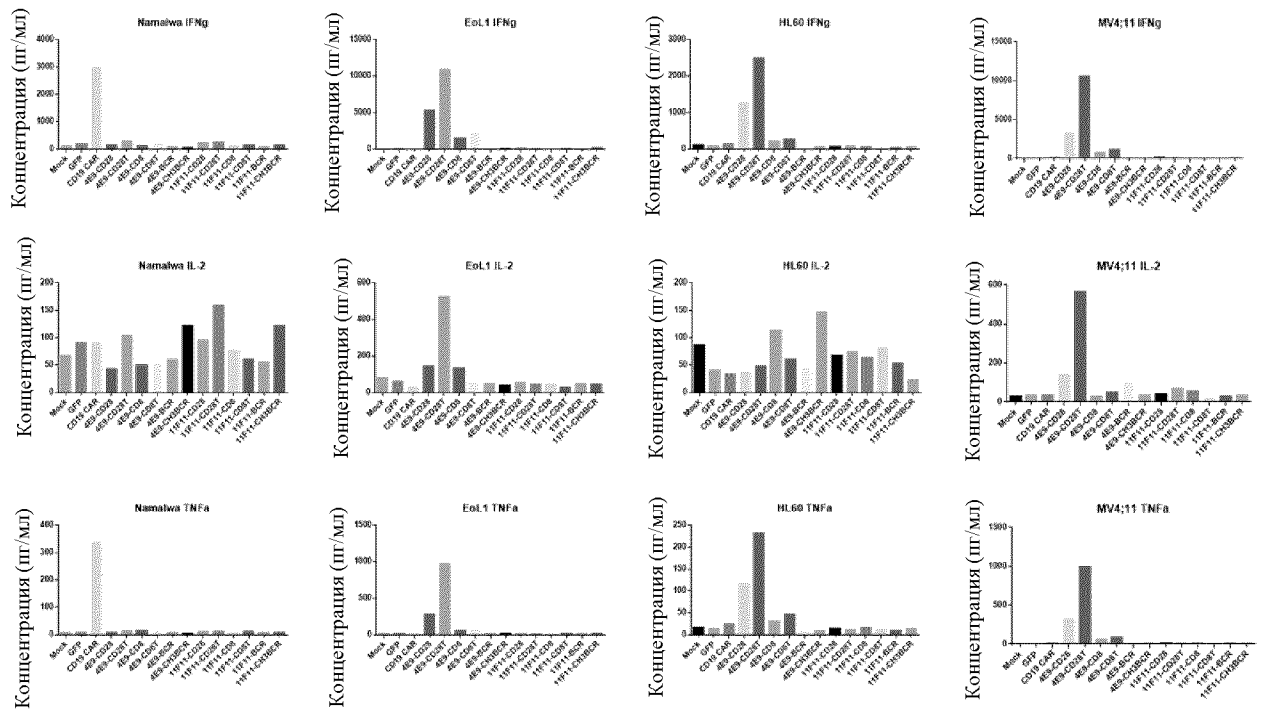


Фиг. 4

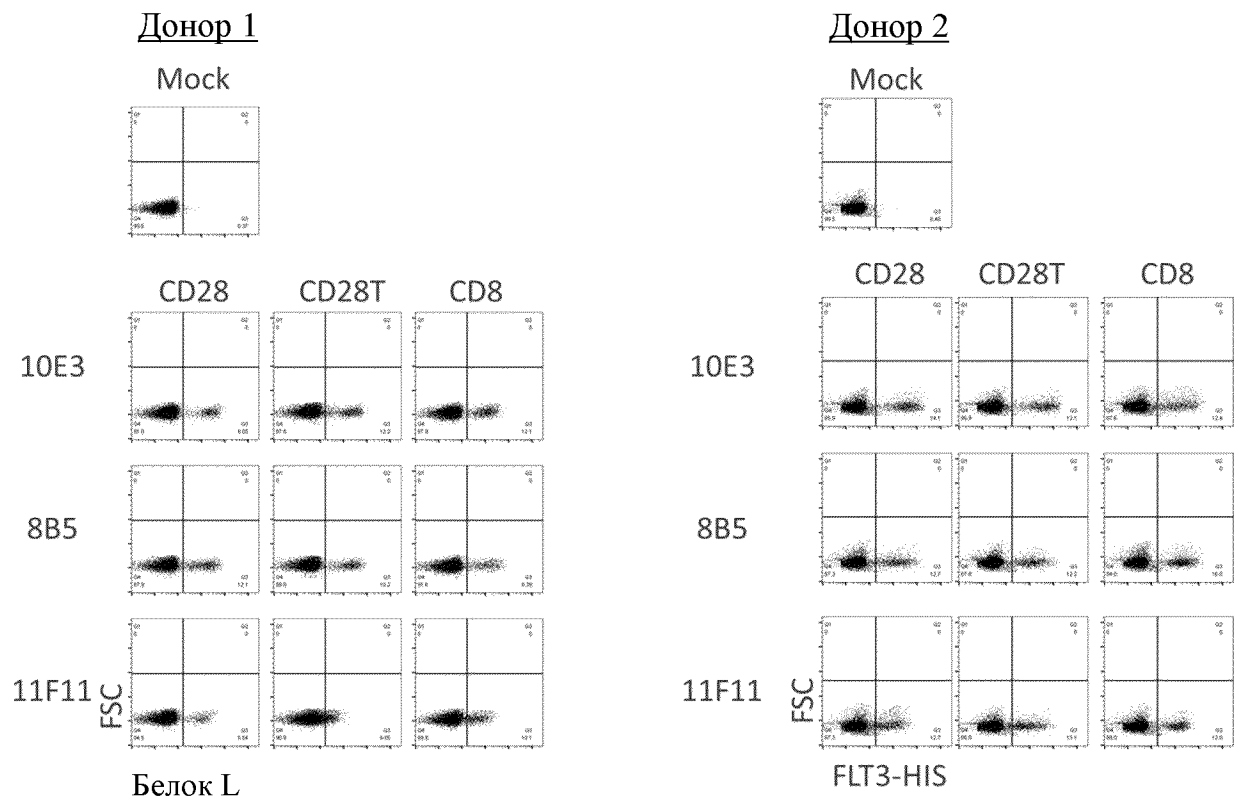
А



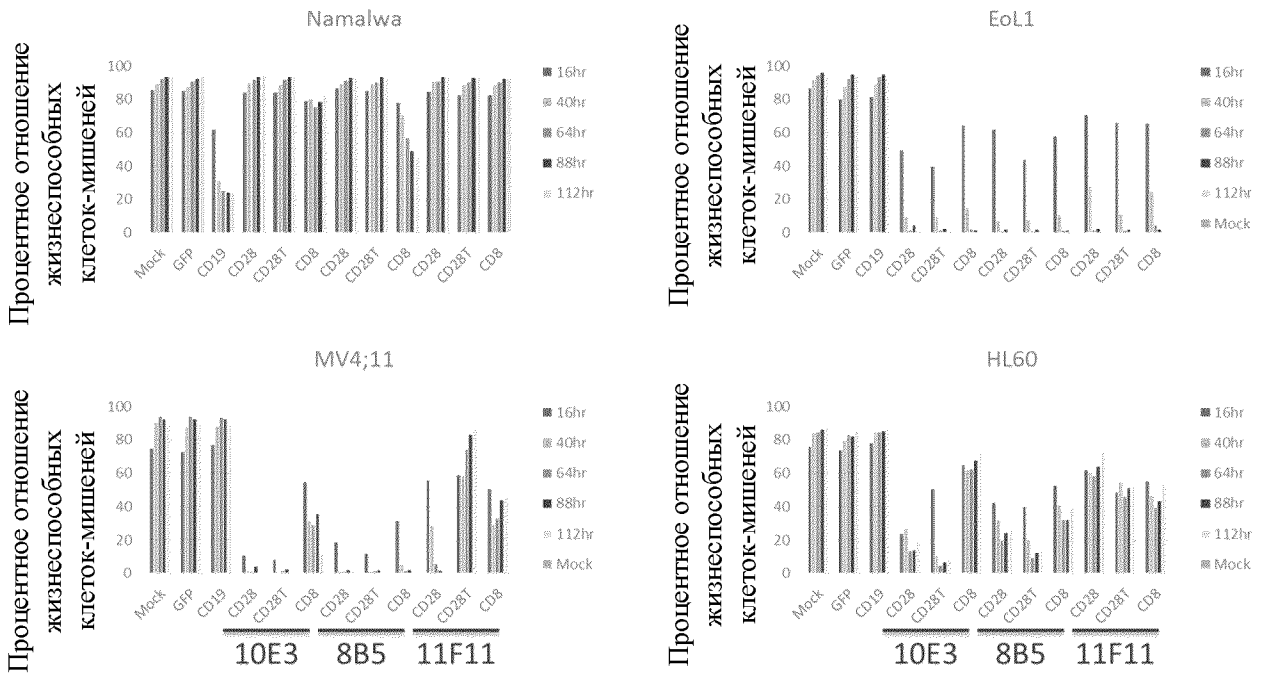
В



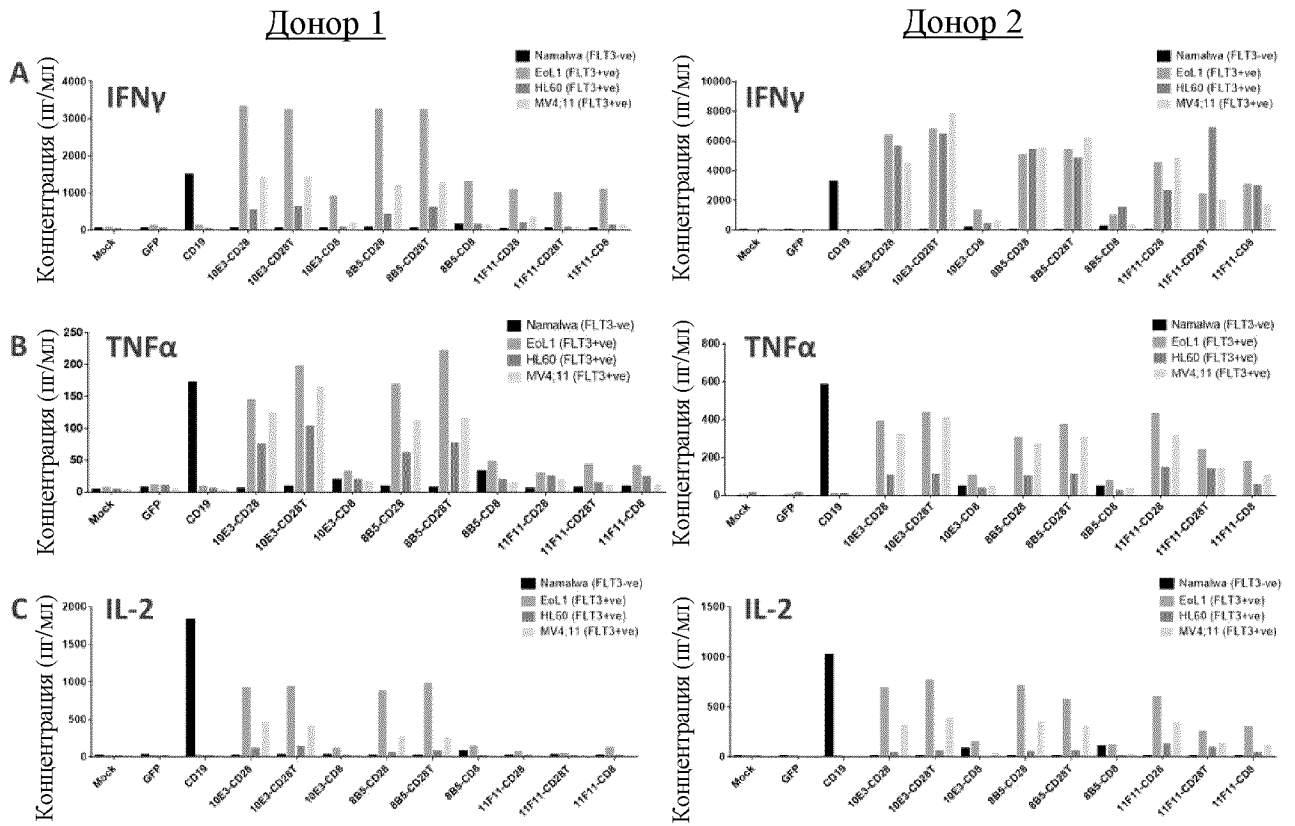
Фиг. 5



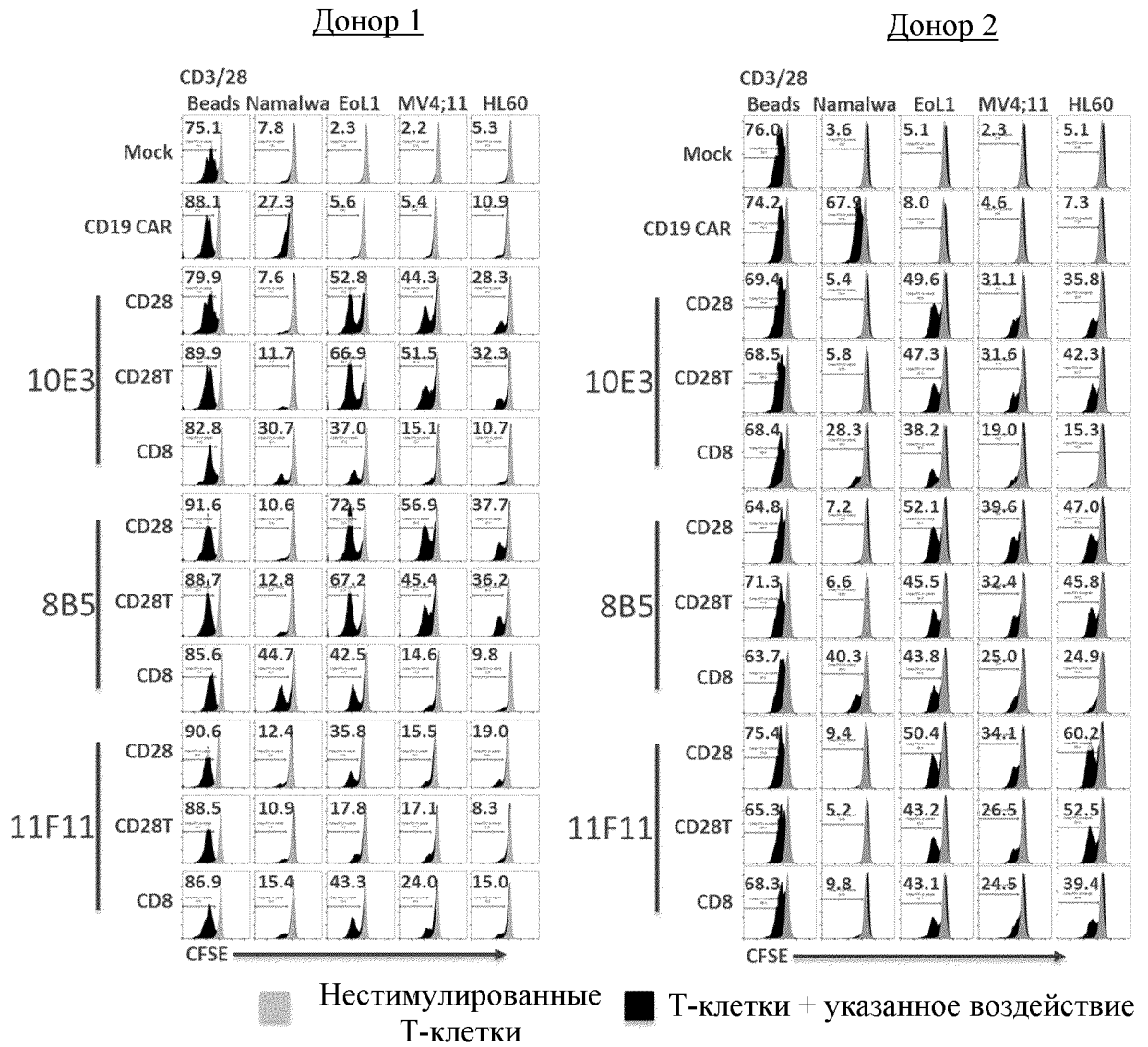
Фиг. 6



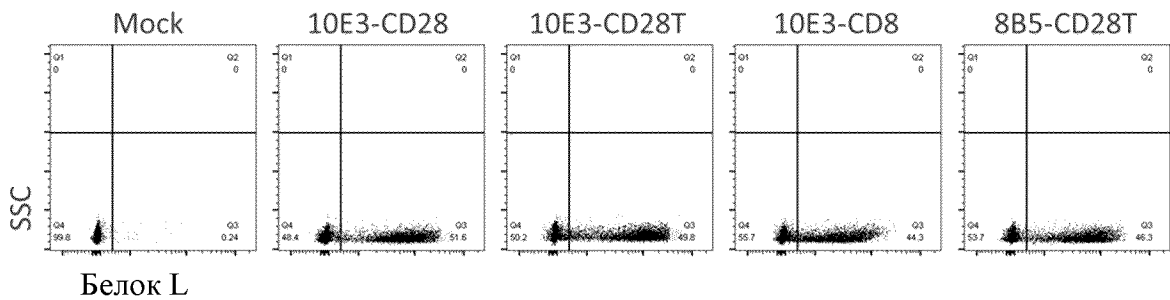
Фиг. 7



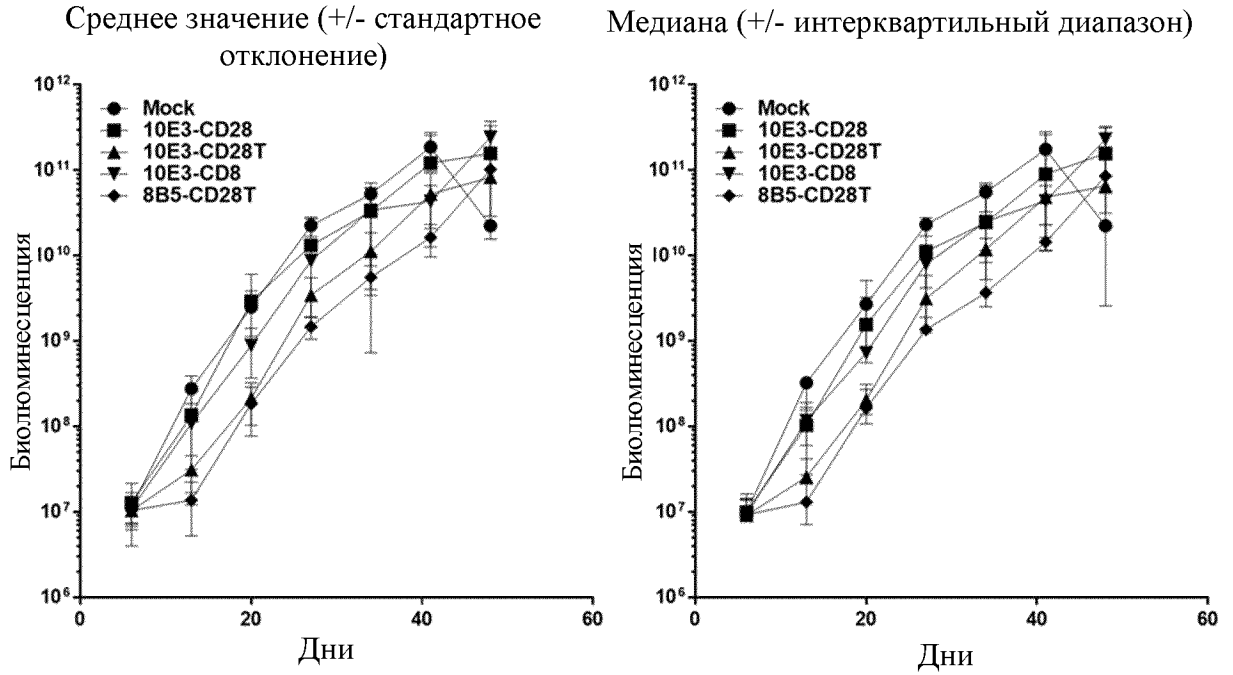
Фиг. 8



Фиг. 9



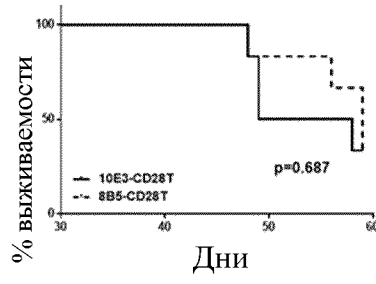
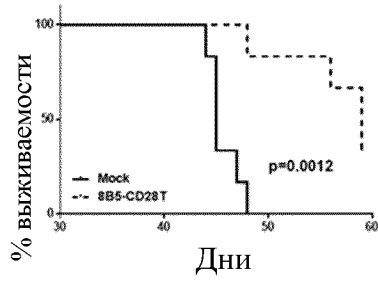
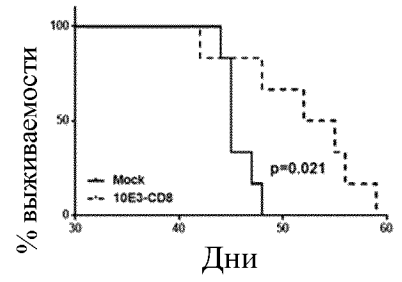
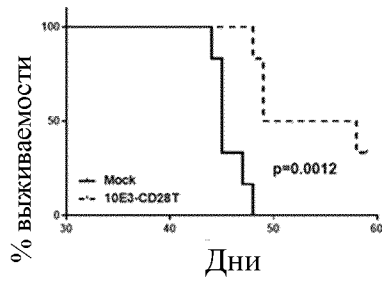
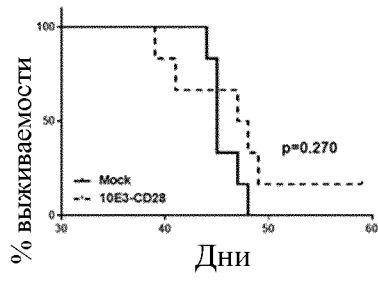
Фиг. 10



p-Значения

День	Mock vs 10E3-CD28	Mock vs 10E3-CD28T	Mock vs 10E3-CD8	Mock vs 8B5-CD28T	10E3-CD28T vs 8B5-CD28T
6	0.756	0.657	0.832	0.690	0.959
13	0.067	0.0004	0.014	0.0002	0.028
20	0.777	0.0022	0.022	0.0020	0.639
27	0.158	<0.0001	0.0036	<0.0001	0.042
34	0.200	0.0004	0.188	0.0001	0.142
41	0.376	0.0072	0.0034	0.0009	0.054

Фиг. 11



Фиг. 12



ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

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

Номер евразийской заявки:

202391764А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:
См. дополнительный лист

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

A61K 39/00, C07K 16/28, C07K 14/705, C07K 14/725, C12N 15/13, C12N 15/62, C12N 15/85, C12N 5/078, A61P 35/00

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
EAPATIS, Espacenet, Patentscope, USPTO, PubMed, EMBL-EBI, Google

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	WO 2015142675 A2 (NOVARTIS AG И ДР.) 2015-09-24 весь документ	1-23
A	US 20040043401 A1 (SLOAN KETTERING INST CANCER) 2004-03-04 весь документ	1-23
A	OBDULIO PILOTO 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 RES, February 15 2005, Vol.65, No.4, p.1514-1522 doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3081 весь документ	1-23
A	EA 201390847 A1 (ДЗЕ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ ПЕНСИЛЬВАНИЯ) 2013-12-30 весь документ	1-23

 последующие документы указаны в продолжении графы

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

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

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

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

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

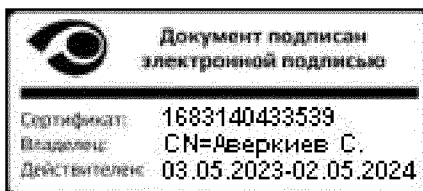
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

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

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 19 декабря 2023 (19.12.2023)

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы

Е. Аверкиев

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

202391764

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

МПК:

C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 5/078 (2010.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

СПК:

C07K 14/7051
C07K 14/70596
C07K 16/2863
C12N 15/62
C12N 15/85
C12N 5/0636
A61K 39/0011
A61K 35/17
C12Y 207/10001
C07K 2319/00
C07K 2319/03
C07K 2319/33
C12N 2510/00
A61K 2039/505
A61K 2039/5156
A61K 2039/5158
A61P 35/02
A61P 37/00