(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202190181 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.05.27

(22) Дата подачи заявки
2019.07.03

(51) Int. Cl. ***C12N 5/078*** (2010.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ИММУНОТЕРАПИИ FLT3, PD-1 И/ИЛИ PD-L1

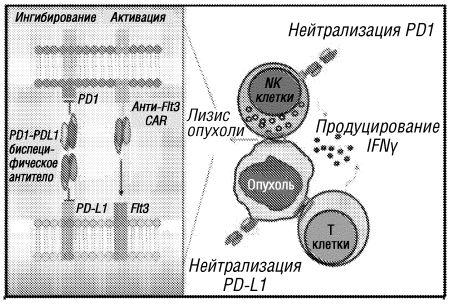
(31) **62/693,977**
(32) **2018.07.04**
(33) **US**
(86) **PCT/US2019/040654**
(87) **WO 2020/010284 2020.01.09**

(71) Заявитель:
САЙТОИММЬЮН ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Юй Цзяньхуа, Калиджури Майкл (US)

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

(57) CAR клетки, направленные на антигены FLT3 в комбинации с секретированными анти-PD-1 и анти-PD-L1 антителами или анти-PD-1-анти-PD-L1 биспецифическими антителами, описаны как новый способ лечения рака. Предполагается, что эти комбинированные терапии являются безопасными и эффективными для пациентов и могут быть использованы для лечения опухолей и рака у человека.



202190181 A1

202190181 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-567078EA/032

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ИММУНОТЕРАПИИ FLT3, PD-1, И/ИЛИ PD-L1

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По настоящей заявке испрашивается приоритет согласно 35 U.S.C. § 119(e) к предварительной заявке США № 62/693,977, поданной 4 июля 2018, содержание которой включено в качестве ссылки полностью.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее описание относится в общем к области иммунологии человека, в частности, иммунотерапии.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) является распространенным гематологическим раком. По оценкам, в 2019 году прогнозируется 21450 новых случаев заболевания, см. cancer.org/cancer/acute-myeloid-leukemia/about/key-statistics.htm, последний доступ 2 июля 2019 года. Хотя болезнь реагирует на индукционную и консолидирующую химиотерапию, рецидивы неизбежно возникают у большинства пациентов. Протокол лечения пациентов с ОМЛ старше 65 лет особенно неудачен, более 75% пациентов умирают от болезни в течение 5 лет; таким образом, лечение не было оптимизировано. Поэтому новые способы лечения этого заболевания должны стать приоритетом. В этом описании представлены такие новые способы, композиции для использования в них, а также связанные с ними преимущества.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Несмотря на гетерогенность ОМЛ в целом, многие типы ОМЛ имеют общую экспрессию FLT3, которая присутствует примерно у 80% пациентов, с высокой поверхностной плотностью экспрессии примерно у 20% пациентов с ОМЛ. Кроме того, до 80% бластных клеток пациентов с ОМЛ могут экспрессировать лиганд для PD-1, называемый PD-L1, в то время как поверхностная экспрессия PD-1 может быть обнаружена на большинстве Т-клеток пациентов с ОМЛ.

Терапия химерным антигенным рецептором (CAR) является одной из наиболее успешных клеточных иммунных терапий для лимфоидных злокачественных образований. CAR является генетически сконструированным иммунным поверхностным рецептором, содержащим Fab часть антитела, направленного против опухолевого антигена(ов), и связывается с внутриклеточными доменами молекул активации, таких как CD28 и CD3ζ. Доклинические модели CAR, экспрессированных на Т клетках и естественных киллерах (NK), направленных против ОМЛ-ассоциированных антигенов, показывают многообещающие эффекты лечения. Так как NK-клетки, в отличие от Т-клеток, не вызывают заболевание трансплантат против хозяина (GVHD), CAR NK клетки могут быть важной альтернативной CAR Т клеткам. В недавнем исследовании на анти-CD19 CAR Т-клетках, 30% пациентов с B-ALL не отвечали на CAR Т терапию из-за альтернативно

сплайсированных CD19 изоформ и ослабленного анти-CD19 CAR эпитопа. Т клетки не способны к «естественному лизису», т.е. они требуют CAR триггера для уничтожения опухолевых клеток. NK клетки обладают спонтанной цитотоксичностью и поэтому могут уничтожать определенные опухолевые мишени, такие как ОМЛ, даже в отсутствие стимулированного CAR. Поэтому врожденные цитолитические механизмы NK-клеток могут обеспечивать вторичную защиту от избегания противоракового ответа на терапию CAR. Понимание того, как CAR функционирует в других иммунных клетках, таких как NK-клетки, будет иметь большое значение и поможет создать альтернативные или комплементарные способы в конструировании следующего поколения CAR T- и CAR NK-клеточной терапии.

Ингибиторы контрольной точки, такие как анти-PD-1 Пембролизумаб (Keytruda) и анти-PD-L1 Атезолизумаб (Tecentriq), и другие активно исследовали во многих клинических испытаниях. Однако некоторые токсические свойства препятствовали дальнейшему развитию. Например, недавнее клиническое испытание фазы III пембролизумаба было остановлено из-за общей токсичности. Это может быть связано с массивной активацией Т-клеток и системным аутоиммунным эффектом. Местная доставка анти-PD-1 антитела или анти-PD-L1 антитела может быть предпочтительнее. Также, лечение ОМЛ с помощью CAR, направленных против CD123 или CD33, еще не продемонстрировало какого-либо клинического успеха. Не будучи связанным теорией, заявитель предполагает, что CAR, направленный на FLT3, экспрессированный на бластах ОМЛ, будет иметь терапевтические преимущества для FLT3(+) пациентов с ОМЛ с лучшим профилем безопасности.

Более того, одобренные FDA анти-PD-1 и анти-PD-L1 моноклональные антитела (mAb) вводятся системно и связываются со всеми клетками, экспрессирующими либо PD-1(+), либо PD-L1. Системная внутривенная инфузия этих mAb включает инфузию больших доз и связана с легкими, умеренными и тяжелыми побочными эффектами, включая усталость, гипертермию (лихорадку), озноб и «инфузионные реакции», каждая из которых требует медицинской помощи. Реакции на инфузию возникают нечасто, но могут привести к серьезной потере артериального давления, требующей жидкостной реанимации вместе с лекарствами. Дополнительные хорошо задокументированные токсические эффекты от легких до тяжелых, связанные с введением этих mAb, включают дерматологическую, желудочно-кишечную, эндокринную, печеночную и легочную токсичность. См., например, Naidoo et al. (2015) Annals of Oncology, Volume 26, Issue 12, страницы 2375–2391. CAR T или NK клетки этого описания исключают необходимость во множестве отдельных внутривенных инфузий анти-PD-1 или анти-PD-L1 mAb через конструирование CAR T или NK клеток, секретирующих анти-PD-1 или анти-PD-L1 mAb сразу же после инфузии CAR T или NK клеток в тело. Следовательно, CAR T или NK клетка по настоящему описанию исключает необходимость в больших фармакологических насыщающих дозах анти-PD-1 и/или анти-PD-L1 mAb, вливаемых в кровоток при отдельном, повторяющемся введении. Основываясь на опубликованных к

настоящему времени данных о фармакологии и токсичности, разумно предположить, что это изобретение позволит избежать немедленного насыщения всех PD-1(+) T или NK клеток анти-PD-1 mAb, что весьма вероятно, частично или полностью снизит побочные эффекты, отмеченные выше. Кроме того, (1) высвобождение антитела будет происходить только от CAR T или NK клеток по мере их размножения, поэтому высвобождение анти-PD-1 или анти-PD-L1 mAb в кровоток будет постепенным; (2) учитывая, что CAR размещает CAR T или NK клетки в опухоли, высвобождение анти-PD-1 или анти-PD-L1 mAb будет в большей степени ограничено микросредой опухоли по сравнению с множественными массивными внутривенными системными введениями, которые в настоящее время одобрены FDA, и, следовательно, будет локализовать его противоопухолевое действие в большей степени на соответствующих T или NK клетках в микросреде опухоли. Кроме того, этот подход приведет к огромной экономии средств (приблизительно шестизначная экономии) для пациента, поскольку отпадет необходимость в инфузиях анти-PD-1 или анти-PD-L1 mAb.

Неожиданно недавно появилось сообщение о том, что человеческие естественные киллеры от больных раком экспрессируют PD-L1, и неожиданно было обнаружено, что анти-PD-L1 антитело, связанное с NK клетками, усиливает уничтожение NK клетками опухолевых клеток. Таким образом, это раскрытие, в соответствии с которым инфицированные NK-клетки экспрессируют как CAR, так и секретируемый анти-PD-L1, может значительно усилить уничтожение NK клетками опухолевых клеток локально в микросреде опухоли.

Исходя из этого, в настоящем документе описаны один или более векторов или выделенных полинуклеотидов, содержащих или, альтернативно, состоящих по существу из, или дополнительно состоящих из полинуклеотида, кодирующего последовательность нуклеиновой кислоты химерного антигенного рецептора (CAR), содержащую: (a) антигенсвязывающий домен FLT3 антитела; (b) шарнирный домен; (c) трансмембранный домен; (d) и внутриклеточный домен; и полинуклеотид, кодирующий последовательность нуклеиновой кислоты антитела, содержащую антигенсвязывающий домен, который распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1. В некоторых вариантах осуществления, непрерывный полинуклеотид или отдельный вектор дополнительно содержит, или дополнительно состоит по существу из, или также дополнительно состоит из обоих из полинуклеотида, кодирующего последовательность нуклеиновой кислоты CAR, содержащую: (a) антигенсвязывающий домен FLT3 антитела; (b) шарнирный домен; (c) трансмембранный домен; (d) и внутриклеточный домен; и полинуклеотида, кодирующего последовательность нуклеиновой кислоты антитела, содержащую антигенсвязывающий домен, который распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1. В других вариантах осуществления, представлена выделенная нуклеиновая кислота или вектор, содержащий или, альтернативно, состоящий по существу из, или, также дополнительно состоящий из:

a. полинуклеотида, кодирующего химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий или, альтернативно, состоящий по существу из, или, также дополнительно

состоящий из: (a) антигенсвязывающего домена FLT3 антитела; (b) шарнирного домена; (c) трансмембранного домена; (d) и внутриклеточного домена; и

b. полинуклеотида, кодирующего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий или, альтернативно, состоящий по существу из, или, также дополнительно состоящий из антигенсвязывающего домена, который распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1.

В других вариантах осуществления, вектор может быть полицистронным, необязательно, бицистронным, и/или каждый из полинуклеотидов может быть функционально связан с регулирующими полинуклеотидными последовательностями, такими как энхансерные элементы и/или промоторные элементы.

Пример непрерывного полинуклеотида по настоящему описанию показан на **ФИГ. 1**. В некоторых вариантах осуществления, в описании представлено, что каждый из полинуклеотидов, кодирующих последовательность нуклеиновой кислоты CAR, как описано выше и ниже, и в одном аспекте, CAR, содержащий: (1) (a) антигенсвязывающий домен FLT3 антитела; (b) шарнирный домен; (c) трансмембранный домен; (d) и внутриклеточный домен; и (2) полинуклеотид, кодирующий последовательность нуклеиновой кислоты a антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего антигенсвязывающий домен, который распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1, полинуклеотиды (1) и (2) состоят из отдельных независимых полинуклеотидов или находятся в разных векторах.

В любом из представленных выше вариантов осуществления, вектор или векторы являются плазмидой или вирусным вектором, необязательно выбранным из группы ретровирусного вектора, лентивирусного вектора, аденовирусного вектора и аденоассоциированного вирусного вектора.

В любом из представленных выше вариантов осуществления, полинуклеотиды и/или вектор или векторы могут необязательно содержать, или альтернативно состоять по существу из, или дополнительно состоять из определяемой метки и/или полинуклеотида, придающего устойчивость к антибиотикам, и/или регуляторных элементов для транскрипции и трансляции для CAR и антигенсвязывающего домена, который распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1. В дополнительном аспекте, терапевтические способы объединяют с диагностическими способами, которые идентифицируют субъекта или пациента как подходящего для терапии через анализ подходящего образца, взятого у пациента или субъекта для экспрессии FLT3 и/или PD-1 и/или PD-L1, и определения того, что пациент или субъект экспрессирует один, два или три из FLT3, PD-1 и/или PD-L1, как подходящего для терапии. В дополнительном аспекте, терапевтический агент затем вводят субъекту или пациенту. Подходящие образцы включают такие, которые содержат раковые и/или опухолевые клетки.

Выделенная нуклеиновая кислота или вектор, описанный выше, кодирующий CAR, может содержать, или, альтернативно, состоять по существу из, или также дополнительно состоять из любого CAR, раскрытого здесь. В одном аспекте, выделенная нуклеиновая

кислота или вектор по настоящему описанию, кодирующий CAR, дополнительно содержит, или, альтернативно, состоит по существу из, или также дополнительно состоит из сигнального домена. В другом аспекте, выделенная нуклеиновая кислота или вектор, кодирующий CAR, дополнительно содержит индуцируемый или конститутивно активный элемент. В одном варианте осуществления, индуцируемый или конститутивно активный элемент контролирует экспрессию полинуклеотида, кодирующего иммунорегуляторную молекулу или цитокин. Иммунорегуляторная молекула или цитокин может содержать, или, альтернативно, состоять по существу из, или также дополнительно состоять из одного или нескольких из B7.1, CCL19, CCL21, CD40L, CD137L, GITRL, GM-CSF, IL-12, IL-2, низкотоксичного IL-2, IL-15, IL-18, IL-21, LEC и/или OX40L. В другом аспекте, иммунорегуляторная молекула или цитокин может содержать, или, альтернативно, состоять по существу из, или также дополнительно состоять из IL-12 и/или GM-CSF; и/или IL-12 и/или одного или нескольких из IL-2 и низкотоксичного IL-2; и/или IL-12 и/или IL-15; и/или IL-12 и/или IL-21; IL-12 и/или B7.1; и/или IL-12 и/или OX40L; и/или IL-12 и/или CD40L; и/или IL-12 и/или GITRL; и/или IL-12 и/или IL-18; и/или одного или нескольких из IL-2 и низкотоксичного IL-2 и одного или нескольких из CCL19, CCL21 и LEC; и/или IL-15 и одного или нескольких из CCL19, CCL21 и LEC; и/или IL-21 и одного или нескольких из CCL19, CCL21 и LEC; и/или GM-CSF и одного или нескольких из CCL19, CCL21 и LEC; и/или OX40L и одного или нескольких из CCL19, CCL21 и LEC; и/или CD137L и одного или нескольких из CCL19, CCL21 и LEC; и/или содержит B7.1 и один или более из CCL19, CCL21 и LEC; и/или CD40L и один или более из CCL19, CCL21 и LEC; и/или GITRL и один или более из CCL19, CCL21 и LEC.

В любом из представленных выше вариантов осуществления, каждый из полинуклеотидов может быть функционально связан с регуляторным полинуклеотидом, необязательно, промотором и/или энхансером. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий антигенсвязывающий домен, который распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1, функционально связан с промотором и/или энхансером, который позволяет низку, умеренную или высокую экспрессию, или также дополнительно, сверхэкспрессию антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В любом из представленных выше вариантов осуществления, полинуклеотид, кодирующий CAR, может содержать или, альтернативно, состоять по существу из или дополнительно состоять из полинуклеотида, кодирующего: (a) антигенсвязывающий домен FLT3 антитела; (b) CD8α шарнирный домен; (c) CD8α трансмембранный домен; (d) CD28 костимулирующую сигнальную область и/или 4-1BB костимулирующую сигнальную область; и (e) CD3 дзета (ξ) сигнальный домен. Не ограничивающие примеры FLT3 антитела содержат или, альтернативно, состоят по существу из или дополнительно состоят из переменной области тяжелой цепи, содержащей: CDHR1, имеющую аминокислотную последовательность (SYWMH) или (NYGLH) или эквивалент каждой из них, CDHR2, имеющую аминокислотную последовательность (EIDPSDSYKDYNQKFKD)

или (VIWSGGSTDYNAAFIS) или эквивалент каждой из них, и CDHR3, имеющую аминокислотную последовательность (AITTTPFDF) или (GGIYYANHYYAMDY) или эквивалент каждой из них, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую: CDLR1, имеющую аминокислотную последовательность (RASQSISNNLH) или (KSSQSLLNSGNQKNYM) или эквивалент каждой из них, CDLR2, имеющую аминокислотную последовательность (YASQSIS) или (GASTRES) или эквивалент каждой из них, и CDLR3, имеющую аминокислотную последовательность (QQSNTWPYT) или (QNDHSYPLT) или эквивалент каждой из них.

Не ограничивающие примеры антитела, содержащего антигенсвязывающий домен, который распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент, включают PD-1 антагонист или агонист и/или PD-L1 антагонист или агонист. В определенных вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит или, альтернативно, состоит по существу из или дополнительно состоит из релевантных CDR областей антитела к PD-1 и/или антитела к PD-L1, или эквивалент каждой из них. В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит или, альтернативно, состоит по существу из или дополнительно состоит из переменной области тяжелой цепи и/или легкой цепи антитела к PD-1 и/или PD-L1, и/или эквивалента каждой из них. В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит или состоит по существу из или дополнительно состоит из одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), содержащего антигенсвязывающий домен PD-1 антитела, и/или одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), содержащего антигенсвязывающий домен PD-L1 антитела, и/или эквивалент каждого из них. В некоторых вариантах осуществления, антитело, содержащее антигенсвязывающий домен, который распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит или состоит по существу из или дополнительно состоит из а одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), содержащего антигенсвязывающий домен PD-L1 антитела.

В некоторых вариантах осуществления, антителом или антигенсвязывающим фрагментом является биспецифическое антитело. Не ограничивающие примеры биспецифического антитела включают релевантные CDR области антитела к PD-1 и антитела к PD-L1, или эквивалент каждой из них, и, необязательно, линкер. Дополнительные не ограничивающие примеры включают релевантные CDR области антитела к PD-1 и антитела PD-L1, или эквивалент каждой из них и, необязательно, линкер. Дополнительный пример включает вариабельную область тяжелой цепи и/или легкой цепи антитела к PD-1 и/или PD-L1 и эквивалент каждой из них и, необязательно, линкер. Еще один пример включает одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий или, альтернативно, состоящий по существу из, или, также дополнительно состоящий из, антигенсвязывающего домена PD-1 антитела и одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) содержащий или, альтернативно, состоящий по существу из, или, также дополнительно состоящий из, антигенсвязывающего домена PD-L1

антитела, и/или эквивалент каждого из них и, необязательно, линкер.

Также в настоящем документе представлена выделенная клетка, содержащая или альтернативно состоящая по существу из или состоящая из одного или нескольких из антител, векторов и/или выделенных полинуклеотидов по любому из представленных выше вариантов, отдельно или в комбинации друг с другом. Клеткой может быть прокариотическая или эукариотическая клетка, и ее необязательно выбирают из клетки животного, клетки млекопитающего, клетки коровы, клетки кошки, клетки собаки, клетки мыши, клетки лошади или клетки человека. В некоторых вариантах осуществления, эукариотической клеткой является иммунная клетка, необязательно, Т-клетка, В-клетка, NK-клетка, дендритная клетка, миелоидная клетка, моноцит или макрофаг. В других вариантах осуществления, иммунной клеткой является Т-клетка, которая необязательно может быть модифицирована для подавления эндогенной экспрессии TCR с применением любой подходящей системы, например, CRISPR системы. В любом из представленных выше вариантов осуществления, относящихся к выделенной клетке, выделенная клетка экспрессирует CAR на поверхности клетки и секретирует антитело, содержащее антигенсвязывающий домен, который распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент, необязательно биспецифическое антитело.

Дополнительные аспекты относятся к композиции, содержащей один или более из векторов и/или выделенных нуклеиновых кислот и/или выделенных клеток, описанных в настоящем документе, и, необязательно, носитель, который, необязательно, является фармацевтически приемлемым носителем. Также в настоящем документе представлена композиция, содержащая или, альтернативно, состоящая по существу из, или, также дополнительно состоящая из выделенной нуклеиновой кислоты или вектора, антитела, антигенсвязывающего фрагмента, полипептида, выделенной клетки и/или популяции клеток, раскрытых в настоящем документе, и, необязательно, фармацевтически приемлемого носителя. В других вариантах осуществления, композиция содержит или альтернативно состоит по существу из или состоит из эффективного количества ингибитора FLT3. В некоторых вариантах осуществления, эффективным количеством является количество, эффективное для повышения поверхностной экспрессии FLT3 на раковой или опухолевой клетке.

В этом описании также представлен выделенный комплекс, содержащий любую из выделенных клеток, экспрессирующих CAR, связанный с: (i) клеткой, экспрессирующей FLT3 и/или PD-1 и/или PD-L1 и/или его фрагмент и/или, (ii) FLT3 и/или PD-1 и/или PD-L1 и/или его фрагмент.

Также раскрыты способы получения CAR экспрессирующей клетки. Способы включают трансдукцию выделенной клетки с полинуклеотидом или вектором, как раскрыто в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, выделенные клетки выбраны из группы, состоящей из Т-клеток, В-клеток, NK-клеток, дендритных клеток, миелоидных клеток, моноцитов или макрофагов. В некоторых вариантах осуществления, выделенные клетки выбраны из группы, состоящей из Т-клеток, В-клеток,

NK-клеток, дендритных клеток, миелоидных клеток, моноцитов или макрофагов. В других вариантах осуществления, выделенными клетками являются Т-клетки, которые необязательно модифицированы для подавления эндогенной экспрессии TCR. В других вариантах осуществления, выделенными клетками являются NK клетки. Клетки могут быть выделены из любых подходящих видов, например, млекопитающего, например, клетки человека.

Клетки, экспрессирующие CAR, применяют диагностически и терапевтически. В одном аспекте, клетки применяют в способе ингибирования роста раковой клетки или опухолевой клетки, каждая из которых экспрессирует FLT3, необязательно, где клеткой является FLT3 клетка острого миелоидного лейкоза (ОМЛ). Это описание также относится к способам ингибирования роста рака или опухоли, экспрессирующей FLT3, необязательно, острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) у субъекта, включающим или, альтернативно, состоящий по существу из, или, также дополнительно состоящий из контакта рака или опухоли с выделенной клеткой или композицией по настоящему описанию. В одном аспекте, способ ингибирования роста рака или опухоли, экспрессирующей FLT3, у субъекта, необязательно ОМЛ, включает или альтернативно состоит по существу из или также дополнительно состоит из измерения экспрессии PD-1 и/или PD-L1 у субъекта и введения выделенной клетки, антитела, антигенсвязывающего фрагмента и/или композиции по настоящему описанию субъекту, экспрессирующему PD-1 и/или PD-L1. Дополнительно в настоящем документе раскрыты способы ингибирования роста рака или опухоли у субъекта, необязательно, ОМЛ, включающие или, альтернативно, состоящие по существу из, или, также дополнительно состоящие из измерения экспрессии PD-1 и/или PD-L1 у субъекта и введение антитела, антигенсвязывающего фрагмента и/или композиции субъекту, экспрессирующему PD-1 и/или PD-L1. Способы могут включать или, альтернативно, состоять по существу из, или дополнительно состоять из контакта раковой клетки или опухоли с любой из выделенных клеток или композиций, раскрытых в настоящем документе выше. Контакт может быть in vitro или in vivo. В некоторых вариантах осуществления, контакт происходит in vivo и выделенные клетки являются аутологичными и/или аллогенными лечимому субъекту. В других вариантах осуществления, способ дополнительно включает или состоит по существу из или дополнительно состоит из введения субъекту эффективного количества циторедуктивной терапии, необязательно, содержащей или выбранной из группы, состоящей из химиотерапии, криотерапии, гипертермии, таргетной терапии и/или радиационной терапии. В некоторых вариантах осуществления, лечимым субъектом является пациент-человек.

Дополнительно здесь представлены антитела, содержащие или, альтернативно, состоящие по существу из, или, также дополнительно состоящий из последовательности одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), содержащего или, альтернативно, состоящего по существу из, или, также дополнительно состоящего из аминокислотной последовательности

(QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNG
GTNFNEKFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQG
TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWY
QQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPAT
FGQGTKVEIKR) или ее эквивалента. В одном аспекте, антитело, содержащее или, альтернативно, состоящее по существу из, или, также дополнительно состоящее из последовательности одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), кодировано нуклеотидной последовательностью, содержащей или, альтернативно, состоящей по существу из, или, также дополнительно состоящей из последовательности нуклеиновой кислоты:
(CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGCGTTA
AAGTTTCTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGGGTAC
GGCAGGCTCCAGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAACGGC
GGCACTAACTTTAACGAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAACTGACTCAAG
TACGACTACAGCATACATGGAACTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTGTCTA
TTATTGCGCGAGAAGAGACTATCGCTTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGCAAGG
TACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGGTGGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTCAGGTG
GAGGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCCCCAAGCTCTCTGTCCGCGTCAGTGG
GCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAGATGTGTCAACCGCTGTCGCCT
GGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCCTAAGCTTCTCATCTACTCAGCTTCTTTTC
TGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGGACGGACTTCACAT
TGACCATAAGTTCCTTGCAGCCTGAGGATTTCGCTACATATTATTGCCAACAGTACC
TTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG) или ее эквивалента.

Также описаны антитела, содержащие или, альтернативно, состоящие по существу из, или, также дополнительно состоящие из последовательности одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), содержащей или, альтернативно, состоящей по существу из, или, также дополнительно состоящей из аминокислотной последовательности : (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGST
YYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVT
VSAGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQ
QKPGEAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTF
GGGTKVEIK) или ее эквивалента.

В одном аспекте, антитело содержит или, альтернативно, состоит из или дополнительно состоит из последовательности одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), кодированной нуклеотидной последовательностью, содержащей или, альтернативно, состоящей по существу из, или, также дополнительно состоящей из последовательности нуклеиновой кислоты:
(GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCACTCCG
GTTGTCCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGTGCGC

CAAGCCCCGGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGGGTTC
CACCTACTATGCTGATTCAGTAAAAGGACGGTTCACTATAAGCGCGGATACAAGTA
AGAATACTGCCTATCTTCAAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTATATT
ATTGCGCTAGACGACATTGGCCAGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTTG
TGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGGCAGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGTGGT
TCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCCACATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAGAGA
GCAACTCTGTCATGCCGGGCGTCAAAAGGTGTCAGTACGTCAGGCTACTCCTATCTT
CATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCTTCTCATATACCTGGCTAGT
TACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGGTCTGGGACTGATTTT
ACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACTATTGCCAACAT
TCACGCGATTTGCCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTTGAAATAAAA) или ее эквивалента.

Также здесь описано биспецифическое антитело, содержащее или, альтернативно, состоящее по существу из, или, также дополнительно состоящее из последовательности одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), содержащей или, альтернативно, состоящей по существу из, или, также дополнительно состоящей из аминокислотной последовательности:
(QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNG
GTNFNEKFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQG
TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWY
QQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPAT
FGQGTKVEIKR) и/или
(EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGST
YYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVT
VSAGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQ
QKPGEAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTF
GGGTKVEIK) или эквивалента каждой из них.

В одном аспекте, биспецифическое антитело содержит, или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоят из последовательности одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), кодированной нуклеотидной последовательностью, содержащей или, альтернативно, состоящей по существу из, или, также дополнительно состоящей из последовательности нуклеиновой кислоты:
(CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGCGTTA
AAGTTTCTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGGGTAC
GGCAGGCTCCAGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAACGGC
GGCACTAACTTTAACGAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAACTGACTCAAG
TACGACTACAGCATACATGGAACTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTGTCTA
TTATTGCGCGAGAAGAGACTATCGCTTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGCAAGG
TACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGGTGGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTCAGGTG
GAGGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCCCCAAGCTCTCTGTCCGCGTCAGTGG

GCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAGATGTGTCAACCGCTGTCGCCT
GGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCCTAAGCTTCTCATCTACTCAGCTTCTTTTC
TGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGGACGGACTTCACAT
TGACCATAAGTTCCTTGCAGCCTGAGGATTTCGCTACATATTATTGCCAACAGTACC
TTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG) и/или
(GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCACTCCG
GTTGTCCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGTGCGC
CAAGCCCCGGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGGGTTC
CACCTACTATGCTGATTCAGTAAAAGGACGGTTCACTATAAGCGCGGATACAAGTA
AGAATACTGCCTATCTTCAAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTATATT
ATTGCGCTAGACGACATTGGCCAGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTTG
TGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGGCAGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGTGGT
TCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCCACATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAGAGA
GCAACTCTGTCATGCCGGGCGTCAAAAGGTGTCAGTACGTCAGGCTACTCCTATCTT
CATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCTTCTCATATACCTGGCTAGT
TACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGGTCTGGGACTGATTTT
ACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACTATTGCCAACAT
TCACGCGATTTGCCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTTGAAATAAAA) или их эквивалента.

Антителом может быть IgA, IgD, IgE, IgG или IgM антитело. В одном конкретном аспекте, антитело содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из постоянной области. Константная область может содержать, или, альтернативно, состоять в основном из, или дополнительно состоять из постоянной области IgA, IgD, IgE, IgG или IgM. В некоторых вариантах осуществления, константной областью является константная область IgG1 или константная область Ig каппа.

Это раскрытие также относится к антителам, которые конкурируют за связывание с антителами, описанными здесь. Антителом по настоящему описанию может быть поликлональное, моноклональное или гуманизированное антитело. Также в настоящем документе представлены антигенсвязывающие фрагменты антител по настоящему описанию. Антигенсвязывающий фрагмент может быть выбран из группы, состоящей из Fab, F(ab')2, Fab', scFv и Fv. В одном аспекте, антигенсвязывающий фрагмент может содержать, или, альтернативно, состоять в основном из, или дополнительно состоять из аминокислотной последовательности:
(QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNG
GTNFNEKFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQG
TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWY
QQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPAT
FGQGTKVEIKR) или эквивалента каждой из них. Антигенсвязывающий фрагмент может быть кодирован нуклеотидной последовательностью, содержащей или, альтернативно, состоящей по существу из, или, также дополнительно состоящей из последовательности

нуклеиновой кислоты:
(CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGCGTTA
AAGTTTCTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGGGTAC
GGCAGGCTCCAGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAACGGC
GGCACTAACTTTAACGAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAACTGACTCAAG
TACGACTACAGCATACATGGAACTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTGTCTA
TTATTGCGCGAGAAGAGACTATCGCTTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGCAAGG
TACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGGTGGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTCAGGTG
GAGGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCCCCAAGCTCTCTGTCCGCGTCAGTGG
GCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAGATGTGTCAACCGCTGTCGCCT
GGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCCTAAGCTTCTCATCTACTCAGCTTCTTTTC
TGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGGACGGACTTCACAT
TGACCATAAGTTCCTTGCAGCCTGAGGATTTCGCTACATATTATTGCCAACAGTACC
TTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG) или
эквивалента каждой из них.

В другом аспекте, антигенсвязывающий фрагмент может содержать, или, альтернативно, состоять в основном из, или дополнительно состоять из аминокислотной последовательности:
(EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGST
YYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVT
VSAGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQ
QKPGEAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTF
GGGTKVEIK) или эквивалента каждой из них. Антигенсвязывающий фрагмент может быть кодирован нуклеотидной последовательностью, содержащей или, альтернативно, состоящей по существу из, или, также дополнительно состоящей из:
(GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCACTCCG
GTTGTCCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGTGCGC
CAAGCCCCGGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGGGTTC
CACCTACTATGCTGATTCAGTAAAAGGACGGTTCACTATAAGCGCGGATACAAGTA
AGAATACTGCCTATCTTCAAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTATATT
ATTGCGCTAGACGACATTGGCCAGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTTG
TGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGGCAGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGTGGT
TCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCCACATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAGAGA
GCAACTCTGTCATGCCGGGCGTCAAAAGGTGTCAGTACGTCAGGCTACTCCTATCTT
CATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCTTCTCATATACCTGGCTAGT
TACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGGTCTGGGACTGATTTT
ACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACTATTGCCAACAT
TCACGCGATTTGCCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTTGAAATAAAA) или
эквивалента каждой из них.

Также в настоящем документе описаны полипептиды, содержащие или,

альтернативно, состоящие по существу из, или, также дополнительно состоящие из аминокислотной последовательности любой из:
(QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNG
GTNFNEKFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQG
TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWY
QQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPAT
FGQGTKVEIKR) или
(EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGST
YYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVT
VSAGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQ
QKPGEAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTF
GGGTKVEIK) или эквивалента каждой из них.

Это раскрытие также относится к выделенным нуклеиновым кислотам, содержащим или, альтернативно, состоящим по существу из, или, также дополнительно состоящим из последовательности нуклеиновой кислоты:
(CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGCGTTA
AAGTTTCTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGGGTAC
GGCAGGCTCCAGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAACGGC
GGCACTAACTTTAACGAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAACTGACTCAAG
TACGACTACAGCATACATGGAACTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTGTCTA
TTATTGCGCGAGAAGAGACTATCGCTTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGCAAGG
TACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGGTGGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTCAGGTG
GAGGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCCCCAAGCTCTCTGTCCGCGTCAGTGG
GCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAGATGTGTCAACCGCTGTCGCCT
GGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCCTAAGCTTCTCATCTACTCAGCTTCTTTTC
TGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGGACGGACTTCACAT
TGACCATAAGTTCCTTGCAGCCTGAGGATTTCGCTACATATTATTGCCAACAGTACC
TTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG) или
(GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCACTCCG
GTTGTCCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGTGCGC
CAAGCCCCGGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGGGTTC
CACCTACTATGCTGATTCAGTAAAAGGACGGTTCACTATAAGCGCGGATACAAGTA
AGAATACTGCCTATCTTCAAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTATATT
ATTGCGCTAGACGACATTGGCCAGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTTG
TGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGGCAGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGTGGT
TCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCCACATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAGAGA
GCAACTCTGTCATGCCGGGCGTCAAAAGGTGTCAGTACGTCAGGCTACTCCTATCTT
CATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCTTCTCATATACCTGGCTAGT
TACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGGTCTGGGACTGATTTT
ACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACTATTGCCAACAT

TCACGCGATTTGCCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTTGAAATAAAA) или эквивалента каждой из них.

Дополнительно раскрыты в настоящем документе способы получения антител по настоящему описанию.

Также в настоящем документе представлены антигенсвязывающие фрагменты антител по настоящему описанию. Дополнительно в настоящем документе описаны полипептиды, содержащие или, альтернативно, состоящие по существу из, или, также дополнительно состоящие из аминокислотной последовательности: (QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNG GTNFNEKFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQG TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPAT FGQGTKVEIKR) или (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGST YYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVT VSAGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQ QKPGEAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTF GGGTKVEIK) или эквивалента каждой из них.

Это раскрытие дополнительно относится к выделенным нуклеиновым кислотам, содержащим или, альтернативно, состоящим по существу из, или, также дополнительно состоящим из а последовательности нуклеиновой кислоты: (CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGCGTTA AAGTTTCTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGGGTAC GGCAGGCTCCAGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAACGGC GGCACTAACTTTAACGAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAACTGACTCAAG TACGACTACAGCATACATGGAACTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTGTCTA TTATTGCGCGAGAAGAGACTATCGCTTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGCAAGG TACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGGTGGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTCAGGTG GAGGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCCCCAAGCTCTCTGTCCGCGTCAGTGG GCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAGATGTGTCAACCGCTGTCGCCT GGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCCTAAGCTTCTCATCTACTCAGCTTCTTTTC TGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGGACGGACTTCACAT TGACCATAAGTTCCTTGCAGCCTGAGGATTTCGCTACATATTATTGCCAACAGTACC TTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG) или (GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCACTCCG GTTGTCCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGTGCGC CAAGCCCCGGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGGGTTC CACCTACTATGCTGATTCAGTAAAAGGACGGTTCACTATAAGCGCGGATACAAGTA AGAATACTGCCTATCTTCAAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTATATT ATTGCGCTAGACGACATTGGCCAGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTTG

TGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGGCAGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGTGGT
TCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCCACATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAGAGA
GCAACTCTGTCATGCCGGGCGTCAAAAGGTGTCAGTACGTCAGGCTACTCCTATCTT
CATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCTTCTCATATACCTGGCTAGT
TACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGGTCTGGGACTGATTTT
ACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACTATTGCCAACAT
TCACGCGATTTGCCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTTGAAATAAAA) или эквивалента каждой из них.

Также раскрыты в настоящем документе наборы, содержащие или альтернативно состоящие по существу из или состоящие из одной или нескольких из указанных выше композиций и инструкций по их применению в способах, раскрытых в настоящем документе.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На **ФИГ. 1** показан дизайн бицистронного FLT3 CAR с секреторном PD-1-PD-L1 биспецифическим антителом (biAb). FLT3 CAR управляется EF1α промотором. PD-1-PD-L1 biAb связано с CAR через T2A и ведется секреторным сигнальным пептидом (SS). Полная кассета фланкирована длинными концевыми повторами в безопасном лентивирусном конструкте.

На **ФИГ. 2A-2C** показана улучшенная цитотоксичность при распознавании клеточных линий FLT3(+) ОМЛ. Цитотоксическая активность модифицированных NK-92 клеток, EV NK-92 клеток и FLT3 CAR NK-92 клеток против: (**ФИГ. 2A**) FLT3(+) MOLM-13 (FLT3(+) EOL-1 или (FLT3(-) U937 клеток; (**ФИГ. 2B**) FLT3(+) ОМЛ бластов от каждого из двух пациентов с применением анализа выделения ^{51}Cr. Лейкозные клетки-мишени метят ^{51}Cr и совместно культивируют с NK-клетками в указанных соотношениях эффектора/мишени (E/T) в лунках 96-луночного V-донного планшета при 37°C в течение 4 часов. Супернатанты собирают и измеряют выделение ^{51}Cr на счетчике TopCount (Canberra Packard). (**ФИГ. 2C**) Цитотоксичность первичных FLT3 CAR NK-клеток против нормальных гемопоэтических стволовых клеток (HSC), определенных как CD34(+), и дендритных клеток, определенных как CD123(+) из костного мозга здоровых доноров. Topro3(+) клетки считают мертвыми.

На **ФИГ. 3A-3C** показано, что FLT3 CAR T и FLT3 NK-клетки подавляют in vivo рост ОМЛ человека и пролонгируют выживание мышей, имеющих ОМЛ. NSG мышам делают инъекцию FLT3(+) MOLM-13 клеток (**ФИГ. 3A**) или FLT3(+) бластов пациента с ОМЛ (**ФИГ. 3B**). Через одну неделю Т-клетки, Т-клетки с пустым вектором или FLT3 CAR Т-клетки вводят внутривенной инъекцией. (**ФИГ. 3C**) Для FLT3(+) CAR NK-клеток, NSG мышам вводят инъекцией FLT3(+) MOLM-13 клетки и NK, NK с пустым вектором или FLT3 CARNK (показаны в настоящем документе как «FLT3 CAR») или вливают ФРФБ. Строят кривые Каплана-Мейера. Δ = непрерывный CR.

На **ФИГ. 4A-4D** показаны FLT-3 CAR NK-клетки и размноженные первичные NK-клетки, экспрессировавшие высокий уровень PD-1. (**ФИГ. 4A**) CAR NK-клетки

культивируют после трансдукции и окрашивают для анти-PD-1 антитела. (**ФИГ. 4B**) Первичные NK-клетки (без трансдукции CAR) экспрессируют PD1 в культуре с IL-2, IL-15 и IL-21. Экспрессия PD1 не была обязательной для трансдукции CAR. (**ФИГ. 4C** и **4D**) Клеточные линии ОМЛ K562 и Molm-13 экспрессируют анти-PD-1-анти-PD-L1 biAb. Данные взяты из одного типового прогона.

На **ФИГ. 5A-5B** показаны уровни секреции анти-PD-1-анти-PD-L1 biAb белка Т-клетками, трансдуцированными FLT3 CAR-анти-PD-1-анти-PD-L1 biAb вектором. Уровни секреции определяют ELISA с применением антител к 6x-his метке на 2 и 3 дни после трансдукции. (**ФИГ. 5A**). Стандартные кривые ELISA. Данные показаны для двух раз. (**ФИГ. 5B**). Уровни секреции анти-PD-1-анти-PD-L1 biAb из FLT3 CAR-анти-PD-1-анти-PD-L1 biAb-трансдуцированных Т-клеток определяют ELISA с применением показанной 6x-his метки. Показаны повторные данные (синий и красный) для двух раз. Данные собирают из значений OD 450 нм на основе стандартной кривой, показанной на **ФИГ. 5A**.

На **ФИГ. 6A-6B** показаны уровни секреции Т-клеток трансдуцированных FLT3 CAR-анти-PD-1, FLT3 CAR-анти-PD-L1 или FLT3 CAR-PD-1-PD-L1 biAb векторами, определенные с применением ELISA с применением антител к 6x-his метке через 5 дней после трансдукции. (**ФИГ. 6A**) Стандартные кривые ELISA. Показаны данные для двух раз. (**ФИГ. 6B**) Уровни секреции анти-PD-1, анти-PD-L1 или PD-1-PD-L1 biAb Т-клетками, трансдуцированными FLT3 CAR-анти-PD-1, FLT3 CAR-анти-PD-L1 или FLT3 CAR-анти-PD-1-анти-PD-L1 biAb вектором, соответственно. Уровни секреции определяют с применением ELISA с применением показанного антитела к 6x-his метке. Показаны данные от трех разных доноров (24, 25, 26, 27).

На **ФИГ. 7** показано заражение и очистка FLT3 CART-клеток, экспрессирующих анти-PD-L1, анти-PD-1, анти-PD-1-анти-PD-L1 biAb, или определенных проточной цитометрией после окрашивания клеток анти-Fab против CAR. Показаны данные для одного типового донора.

На **ФИГ. 8A-8B** показаны результаты четырехчасовых киллинг-анализов на основе потока, которые показали, что очищенные FLT3 CAR-анти-PD-1Т-клетки сохраняют уровни цитотоксичности в виде очищенных FLT3 CART-клеток. (**ФИГ. 8A**) Две клеточные линии FLT3(+) ОМЛ опухоли и одна клеточная линия (FLT3(-) ОМЛ опухоли применяют в качестве клеток-мишеней. Все опухолевые клетки предварительно обрабатывают флуоресцентным красителем AM Fluorescent Dye. Клетки гейтируют на ОМЛ клетки-мишени и клетки, положительные к Sytox Blue (ось Y) представляют способность опухолевых клеток быть уничтоженными. (**ФИГ. 8B**) Суммарные данные **ФИГ. 8A** с тремя соотношениями E:T (эффектор:мишень).

На **ФИГ. 9** показано, что секретированные анти-PD-1Ab из FLT3 анти-PD-1 CAR-Т-клеток повышают жизнеспособность FLT3 CAR Т-клеток. Серые столбцы показывают примированные Т-клетки нелеченных здоровых доноров. Черные столбцы показывают FLT3 CART-клетки (в качестве отрицательного контроля). Светло-зеленые столбцы показывают FLT3 CART-клетки, культивированные с супернатантом, содержащем

секретированные анти-PD-1Ab (15 нг/мл). Заштрихованные светло-зеленые столбцы показывают FLT3 CART-клетки, предварительно обработанные супернатантом, содержащим 15 нг/мл секретированного анти-PD-1Ab, инкубированные с 10 мкг/мл PD-1 слитого белка в течение 30 мин. Темно-зеленые столбцы показывают FLT3 CART-клетки, культивированные с анти-PD-1Ab (BD Biosciences, в качестве положительного контроля). Синие столбцы показывают FLT3-анти-PD-1 CAR Т-клетки, культивированные с супернатантом, содержащим секретированное анти-PD-1Ab (15 нг/мл). Заштрихованные синие столбцы показывают FLT3-анти-PD-1 CAR Т-клетки, культивированные с супернатантом, содержащим секретированное 15 нг/мл анти-PD-1 ab, инкубированного с 10 мкг/мл PD-1 слитого белка в течение 30 мин. Данные суммированы для 7 доноров. Пролиферацию клеток оценивают в анализах MTT.

На **ФИГ. 10** показан количественный анализ поверхностной экспрессии FLT3 в клеточных линиях MOLM-13, U937, THP-1, MV4-11 и EOL-1 ОМЛ, леченных контрольным носителем или следующими ингибиторами FLT3 в течение 48 часов: 10 мкМ Мидостаурина, 10 мкМ FF-10101, 10 мкМ Квизартиниба (AC220) или 10 мкМ Довитиниба (TKI-258). Данные показывают, что в большинстве случаев плотность поверхностной экспрессии FLT3 повышается после лечения ингибитором FLT3.

На **ФИГ. 11** изображен количественный анализ плотности поверхностной экспрессии FLT3 с применением проточной цитометрии на бластах ОМЛ до и после обработки Мидостаурином в течение 48 часов. Чертеж показывает, что плотность поверхностной экспрессии FLT3 на бластах ОМЛ активируется после лечения.

На **ФИГ. 12** изображен предлагаемый механизм взаимодействия FLT3 анти-PD-1-анти-PD-L1 CARNK и FLT3 анти-PD-1-анти-PD-L1 CAR Т клеток с FLT3(+) бластами ОМЛ и секретирования анти-PD-1-анти-PD-L1 biAb, которые блокируют PD1-PD-L1 взаимодействие между PD-1(+) Т клеткой и/или NK клеткой и PD-L1(+) лейкобластами.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Следует понимать, что настоящее описание не ограничивается конкретными описанными аспектами, поскольку они, конечно, могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая здесь терминология предназначена только для описания конкретных аспектов и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего раскрытия будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют те же значения, которые обычно понимаются специалистом в области, к которой принадлежит данная технология. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным здесь, можно использовать на практике или при тестировании настоящей технологии, здесь описаны предпочтительные способы, устройства и материалы. Все цитируемые здесь технические и патентные публикации полностью включены в настоящий документ в качестве ссылки. Ничто в данном документе не должно толковаться как признание того, что настоящая технология не имеет права датировать такое раскрытие задним числом в силу предшествующего раскрытия.

Практика настоящего раскрытия будет использовать, если не указано иное, обычные методы культивирования тканей, иммунологии, молекулярной биологии, микробиологии, клеточной биологии и рекомбинантной ДНК, которые находятся в пределах компетенции специалистов в данной области. См., например, Green и Sambrook eds. (2012) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th edition; the series Ausubel et al. eds. (2015) Current Protocols in Molecular Biology; the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson et al. (2015) PCR 1: A Practical Approach (IRL Press at Oxford University Press); MacPherson et al. (1995) PCR 2: A Practical Approach; McPherson et al. (2006) PCR: The Basics (Garland Science); Harlow and Lane eds. (1999) Antibodies, A Laboratory Manual; Greenfield ed. (2014) Antibodies, A Laboratory Manual; Freshney (2010) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 6th edition; Gait ed. (1984) Oligonucleotide Synthesis; патент США № 4,683,195; Hames and Higgins eds. (1984) Nucleic Acid Hybridization; Anderson (1999) Nucleic Acid Hybridization; Herdewijn ed. (2005) Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications; Hames and Higgins eds. (1984) Transcription and Translation; Buzdin and Lukyanov ed. (2007) Nucleic Acids Hybridization: Modern Applications; Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press (1986)); Grandi ed. (2007) In Vitro Transcription and Translation Protocols, 2nd edition; Guisan ed. (2006) Immobilization of Enzymes and Cells; Perbal (1988) A Practical Guide to Molecular Cloning, 2nd edition; Miller and Calos eds, (1987) Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells; Mayer and Walker eds. (1987) Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Academic Press, London); Lundblad and Macdonald eds. (2010) Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 4th edition; и Herzenberg et al. eds (1996) Weir's Handbook of Experimental Immunology, 5th edition.

Все числовые обозначения, например pH, температура, время, концентрация и молекулярная масса, включая диапазоны, являются приближениями, которые варьируются (+) или (-) с шагом 1,0 или 0,1, в зависимости от ситуации, или, альтернативно, изменением +/- 15%, или, альтернативно, 10%, или, альтернативно, 5%, или, альтернативно, 2%. Следует понимать, хотя это не всегда явно указано, что всем числовым обозначениям предшествует термин «примерно». Также следует понимать, хотя и не всегда явно, что реагенты в настоящем документе описаны только примерно, и что их эквиваленты известны в данной области техники.

Следует сделать вывод без явного упоминания и, если не предполагается иное, что, когда настоящая технология относится к полипептиду, белку, полинуклеотиду или антителу, эквивалент или биологический эквивалент такового подразумевается в рамках настоящей технологии.

Определения

Как используется в описании и формуле изобретения, формы единственного числа «a», «an» и «the» включают множественные ссылки, если контекст явно не диктует иное. Например, термин «клетка» включает множество клеток, включая их смеси.

Используемый в настоящем документе термин «содержащий» предназначен для обозначения того, что композиции и способы включают перечисленные элементы, но не исключают другие. «Состоящий по существу из» при использовании для определения композиций и способов, означает исключение других элементов, имеющих какое-либо существенное значение для комбинации для предполагаемого использования. Например, композиция, состоящая по существу из элементов, как определено здесь, не исключает следы примесей из способа выделения и очистки и фармацевтически приемлемых носителей, таких как физиологический раствор с фосфатным буфером, консерванты и подобные. «Состоящий из» означает исключение более чем следов элементов других ингредиентов и существенных стадий способа введения композиций, раскрытых в настоящем документе. Аспекты, определенные каждым из этих переходных терминов, входят в объем настоящего раскрытия.

Используемый в настоящем документе термин «животное» относится к живым многоклеточным позвоночным организмам, категории, которая включает, например, млекопитающих и птиц. Термин «млекопитающее» включает человека и млекопитающих, отличных от человека.

Термины «субъект», «хозяин», «индивидуум» и «пациент» используются здесь взаимозаменяемо для обозначения человека и ветеринарных субъектов, например людей, животных, приматов, отличных от человека, собак, кошек, овец, мышей, лошадей и коров. В некоторых вариантах осуществления, субъектом является человек.

Используемый в настоящем документе термин «антитело» коллективно относится к иммуноглобулинам или иммуноглобулин-подобным молекулам, включающим, в качестве примера и без ограничений, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, их комбинации и подобные молекулы, продуцированные во время иммунного ответа у любого позвоночного, например, млекопитающего, такого как человек, коза, кролик и мышь, а также видов, не относящихся к млекопитающим, таких как иммуноглобулины акулы. Если специально не указано иное, термин «антитело» включает интактные иммуноглобулины и «фрагменты антител» или «антигенсвязывающие фрагменты», которые специфически связывают молекулу, представляющую интерес (или группу молекул со значительным сходством, представляющих интерес) при значительном исключении связывания с другими молекулами (например, антителами и фрагментами антитела, которые имеют константу связывания для молекулы, представляющей интерес, которая на, по меньшей мере, 10^3 M^{-1} больше, по меньшей мере, 10^4 M^{-1} больше и, по меньшей мере, 10^5 M^{-1} больше, чем константа связывания с другими молекулами в биологическом образце). Термин «антитело» также включает генетически сконструированные формы, такие как химерные антитела (например, мышиные или гуманизированные антитела не приматов), гетероконъюгатные антитела (такие как биспецифические антитела). См. также Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.); Owen et al., Kuby Immunology, 7thEd., W.H. Freeman & Co., 2013; Murphy, Janeway's Immunobiology, 8th Ed., Garland Science, 2014; Male et al.,Immunology (Roitt), 8th Ed., Saunders, 2012; Parham, The

Immune System, 4thEd., Garland Science, 2014.

Используемый в настоящем документе термин «моноклональное антитело» относится к антителу, продуцируемому одним клоном В-лимфоцитов или клеткой, в которую были трансфицированы гены легкой и тяжелой цепей одного антитела. Моноклональные антитела получают способами, известными специалистам в данной области, например, путем получения гибридных антитело-образующих клеток из слияния миеломных клеток с иммунными клетками селезенки. Моноклональные антитела включают гуманизированные моноклональные антитела.

С точки зрения структуры антитела, иммуноглобулин имеет тяжелые (H) цепи и легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Есть два типа легкой цепи: лямбда (λ) и каппа (κ). Существует пять основных классов тяжелой цепи (или изотипов), которые определяют функциональную активность молекулы антитела: IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. Каждая тяжелая и легкая цепь содержит константную область и вариабельную область (области также известны как «домены»). Переменные области тяжелой и легкой цепи специфически связывают антиген. Легкие и переменные область тяжелой цепи содержат «каркасную» область, прерванную тремя гипервариабельными областями, также называемыми «определяющими комплементарность областями» или «CDR». Размер каркасной области и CDR определены (см., Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health и Human Services, 1991, который включен сюда в качестве ссылки). База данных Кэбота теперь ведется онлайн. Последовательности каркасных областей различных легких или тяжелых цепей относительно консервативны в пределах одного вида. Каркасная область антитела, которая представляет собой комбинированные каркасные области составляющих легкой и тяжелой цепей, в значительной степени принимает конформацию β-слоя, и CDR образуют петли, которые соединяют и в некоторых случаях образуют часть структуры β-слоя. Таким образом, каркасные области действуют, образуя каркас, который обеспечивает правильную ориентацию CDR за счет межцепочечных нековалентных взаимодействий.

CDR в первую очередь отвечают за связывание с эпитопом антигена. CDR каждой цепи обычно обозначаются как CDR1, CDR2 и CDR3, пронумерованные последовательно, начиная с N-конца, и также обычно идентифицируются по цепи, в которой расположена конкретная CDR (области тяжелой цепи, помеченные CDHR, и области легкой цепи, помеченные CDLR). Таким образом, CDHR3 представляет собой CDR3 из вариабельного домена тяжелой цепи антитела, в котором она обнаружена, тогда как CDLR1 представляет собой CDR1 из вариабельного домена легкой цепи антитела, в котором она обнаружена. Антитело к FLT3 будет иметь специфическую последовательность области V_H и области V_L, уникальную для антигена FLT3, и, следовательно, специфические последовательности CDR. Антитела с разной специфичностью (т. е. разными связывающими сайтами для разных антигенов) имеют разные CDR. Хотя именно CDR различаются от антитела к антителу, только ограниченное количество аминокислотных положений в CDR непосредственно участвует в связывании антигена. Эти положения в CDR называются

остатками, определяющими специфичность (SDR).

Используемый в настоящем документе термин «PD-1» относится к конкретному фрагменту белка, ассоциированному с этим названием, и любым другим молекулам, имеющим аналогичную биологическую функцию, которые имеют по меньшей мере, 70% или, альтернативно, по меньшей мере, 80% идентичность аминокислотной последовательности, или, альтернативно, 90% идентичность последовательности, или, альтернативно, по меньшей мере, 95% идентичность последовательности с последовательностью PD-1, как показано здесь, и/или подходящим партнером связывания PD-L1. В настоящем документе представлены неограничивающие примеры последовательностей PD-1, такие как, но не ограниченные ими, имеющие следующие ссылочные номера – GCID: GC02M241849; HGNC: 8760; Entrez Gene: 5133; Ensembl: ENSG00000188389; OMIM: 600244; и UniProtKB: Q15116 – и последовательность: MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSN TSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRN DSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVGVVGG LLGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTP EPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL и их эквиваленты.

Неограничивающие примеры коммерчески доступных антител к ним включают пембролизумаб (Merck), ниволумаб (Bristol-Myers Squibb), пидилизумаб (Cure Tech), AMP-224 (GSK), AMP-514 (GSK), PDR001 (Novartis) и цемиплимаб (Regeneron and Sanofi).

Используемый в настоящем документе термин «PD-L1» относится к конкретному фрагменту белка, ассоциированному с этим названием, и любым другим молекулам, имеющим аналогичную биологическую функцию, которые имеют по меньшей мере, 70% или, альтернативно, по меньшей мере, 80% идентичность аминокислотной последовательности, или, альтернативно, 90% идентичность последовательности, или, альтернативно, по меньшей мере, 95% идентичность последовательности с последовательностью PD-L1, как показано здесь, и/или подходящим партнером связывания PD-1. В настоящем документе представлены неограничивающие примеры последовательностей PD-L1, такие как, но не ограниченные ими, имеющие следующие ссылочные номера – GCID: GC09P005450; HGNC: 17635; Entrez Gene: 29126; Ensembl: ENSG00000120217; OMIM: 605402; и UniProtKB: Q9NZQ7 – и последовательность: MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWE MEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMI SYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVL SGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPPNE RTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET и ее эквиваленты. Неограничивающие примеры коммерчески доступных антител к ним включают атезолизумаб (Roche Genentech), авелумаб (Merck Soreno and Pfizer),

дурвалумаб (AstraZeneca), BMS-936559 (Bristol-Myers Suibb) и CK-301 (Chekpoint Therapeutics).

Используемый в настоящем документе термин «антиген» относится к соединению, композиции или веществу, которые могут специфически связываться с продуктами специфического гуморального или клеточного иммунитета, такими как молекула антитела или Т-клеточный рецептор. Антигены могут быть молекулами любого типа, включая, например, гаптены, простые промежуточные метаболиты, сахара (например, олигосахариды), жиры и гормоны, а также макромолекулы, такие как сложные углеводы (например, полисахариды), фосфолипиды и белки. Общие категории антигенов включают, но не ограничиваются ими, вирусные антигены, бактериальные антигены, грибковые антигены, простейшие и другие паразитарные антигены, опухолевые антигены, антигены, участвующие в аутоиммунном заболевании, аллергии и отторжении трансплантата, токсины и другие неклассифицированные антигены.

Используемый в настоящем документе термин «антигенсвязывающий домен» относится к любому белковому или полипептидному домену, который может специфически связываться с мишенью антигена.

Используемый в настоящем документе термин «биспецифическое антитело» относится к антителу, которое может связываться с двумя разными типами антигена, например, имеет два разных антигенсвязывающих домена.

Используемый в настоящем документе термин «сигнальный пептид» относится к пептидной последовательности, которая направляет транспорт и локализацию белка внутри клетки, например, в определенную клеточную органеллу (такую как эндоплазматический ретикулум) и/или поверхность клетки. Неограничивающие примеры сигнального пептида раскрыты в настоящем документе, например, пептид, кодируемый следующей последовательностью нуклеиновой кислоты:

Последовательность сигнального пептида:

ATGGGATGGAGCTCTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCA C и, необязательно, ее эквивалент.

Последовательность сигнального пептида:

MGWSCIILFLVATATGVHS и, необязательно, ее эквивалент.

Последовательность сигнального пептида:

MDWIWRILFLVGAATGAHS и, необязательно, ее эквивалент.

Используемый в настоящем документе термин «специфическое связывание» означает контакт между антителом и антигеном с аффинностью связывания, по меньшей мере, 10^{-6}M. В определенных аспектах, антитела связываются с аффинностью, по меньшей мере, примерно 10^{-7}M и, предпочтительно, 10^{-8}M, 10^{-9}M, 10^{-10}M, 10^{-11}M или 10^{-12}M.

В одном аспекте, термин «эквивалент» или «биологический эквивалент» антитела означает способность антитела селективно связывать его эпитопный белок или его фрагмент, по данным ELISA или других подходящих способов. Биологически

эквивалентные антитела включают, но не ограничиваются ими, такие антитела, пептиды, фрагменты антитела, вариант антитела, производное антитела и миметики антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и эталонное антитело.

Можно предположить без явного цитирования и, если не предполагается иное, что, когда настоящее раскрытие относится к полипептиду, белку, полинуклеотиду или антителу, эквивалент или биологический эквивалент такового подразумевается в объеме настоящего описания. Используемый в настоящем документе термин «его биологический эквивалент» является синонимом для «его эквивалента» при ссылке на эталонный белок, антитело, полипептид или нуклеиновую кислоту, подразумевая те, которые имеют минимальную гомологию, но при этом сохраняют желаемую структуру или функциональность. Если специально не указано здесь, предполагается, что любой полинуклеотид, полипептид или белок, упомянутый в настоящем документе, также включает его эквиваленты. Например, эквивалент подразумевает, по меньшей мере, примерно 70% гомологию или идентичность, или, по меньшей мере, 80% гомологию или идентичность, и альтернативно, или, по меньшей мере, примерно 85%, или альтернативно, по меньшей мере, примерно 90%, или альтернативно, по меньшей мере, примерно 95%, или альтернативно 98% процентов гомологию или идентичность и демонстрирует по существу эквивалентную биологическую активность к эталонному белку, полипептиду или нуклеиновой кислоте. Альтернативно, когда речь идет о полинуклеотидах, его эквивалентом является полинуклеотид, который гидбридизируется в жестких условиях с эталонным полинуклеотидом или его комплементом.

Используемый в настоящем документе термин «аутологичная» в отношении клеток относится к клеткам, которые выделены и влиты обратно тому же субъекту (реципиенту или хозяину). «Аллогенная» относится к не аутологичной клетке.

Используемый в настоящем документе термин «выделенная» относится к молекулам, биологическим или клеточным материалам, по существу не содержащим других материалов. В одном из аспектов, термин «выделенная» относится к нуклеиновым кислотам, таким как ДНК или РНК, или белку, или полипептиду (например, антителу или его производному), или клетке или клеточной органелле, или ткани или органу, отделенным от других ДНК или РНК, или белкам или полипептидам или клеткам или клеточным органеллам или тканям или органам, соответственно, которые присутствуют в природном источнике. Термин «выделенная» также относится к нуклеиновой кислоте или пептиду, который практически не содержит клеточный материал, вирусный материал или культуральную среду при получении способами рекомбинантной ДНК, или химические предшественники или другие химические вещества, когда они синтезированы химически. Более того подразумевается, что «выделенная нуклеиновая кислота» включает фрагменты нуклеиновой кислоты, которые не встречаются в природе в виде фрагментов и не могут быть обнаружены в природном состоянии. Термин «выделенный» также используется здесь для обозначения полипептидов, которые отделены от других клеточных белков, и означает, что он охватывает как очищенные, так и рекомбинантные полипептиды. Термин

«выделенная» также используется здесь для обозначения клеток или тканей, которые отделены от других клеток или тканей, и означает, что он охватывает как культивируемые, так и сконструированные клетки или ткани.

Используемый в настоящем документе термин «выделенная клетка» в общем относится к клетке, которая по существу отделена от других клеток или ткани.

«Иммунные клетки» включают, например, белые кровяные клетки (лейкоциты), которые происходят из гемопоэтических стволовых клеток (HSC), продуцируемых в костном мозге, лимфоциты (Т-клетки, В-клетки, естественные киллеры (NK)) и полученные из миелоидов клетки (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, моноциты, макрофаги, дендритные клетки).

Используемый в настоящем документе термин «NK-клетка» также известная как естественный киллер, относится к типу лимфоцитов, которые возникают в костном мозге и играют важную роль во врожденной иммунной системе. NK-клетки обеспечивают быстрые иммунные ответы против инфицированных вирусом клеток, опухолевых клеток или других клеток, подвергшихся стрессу, даже в отсутствие антител и основного комплекса гистосовместимости на поверхности клеток. NK-клетки могут быть выделены или получены из коммерчески доступного источника. Неограничивающие примеры коммерчески доступных линий NK-клеток включают линии NK-92 (ATCC® CRL-2407™), NK-92MI (ATCC® CRL-2408™). Другие примеры включают, но не ограничены ими, линии NK HANK1, KHYG-1, NKL, NK-YS, NOI-90 и YT. Неограничивающие типовые источники для таких коммерчески доступных клеточных линий включают American Type Culture Collection или ATCC, (atcc.org/) и German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (dsmz.de/).

Используемый в настоящем документе термин «В-клетка» относится к типу лимфоцитов в гуморальном иммунитете адаптивной иммунной системы. В-клетки, в основном, вырабатывают антитела, служат антигенпрезентирующими клетками, высвобождают цитокины и развивают В-клетки памяти после активации взаимодействием антигенов. В-клетки отличаются от других лимфоцитов, таких как Т-клетки, присутствием рецептора В-клеток на поверхности клетки. В-клетки могут быть выделены или получены из коммерчески доступного источника. Неограничивающие примеры коммерчески доступных линий В-клеток включают линии АНН-1 (ATCC® CRL-8146™), BC-1 (ATCC® CRL-2230™), BC-2 (ATCC® CRL-2231™), BC-3 (ATCC® CRL-2277™), CA46 (ATCC® CRL-1648™), DG-75 [D.G.-75] (ATCC® CRL-2625™), DS-1 (ATCC® CRL-11102™), EB-3 [EB3] (ATCC® CCL-85™), Z-138 (ATCC #CRL-3001), DB (ATCC CRL-2289), Toledo (ATCC CRL-2631), Pfiffer (ATCC CRL-2632), SR (ATCC CRL-2262), JM-1 (ATCC CRL-10421), NFS-5 C-1 (ATCC CRL-1693); NFS-70 C10 (ATCC CRL-1694), NFS-25 C-3 (ATCC CRL-1695) и SUP-B15 (ATCC CRL-1929). Другие примеры включают, но не ограничены ими, клеточные линии, полученные из анапластических и крупноклеточных лимфом, например, DEL, DL-40, FE-PD, JB6, Karpas 299, Ki-JK, Mac-2A Ply1, SR-786, SU-DHL-1, -2, -4,-5,-6,-7,-8,-9,-10 и -16, DOHH-2, NU-DHL-1, U-937, Granda 519, USC-DHL-1, RL;

лимфом Ходжкина, например, DEV, HD-70, HDLM-2, HD-MyZ, HKB-1, KM-H2, L 428, L 540, L1236, SBH-1, SUP-HD1, SU/RH-HD-1. Неограничивающие типовые источники для таких коммерчески доступных клеточных линий включают American Type Culture Collection или ATCC, (www.atcc.org/) и German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (https://www.dsmz.de/).

Используемый в настоящем документе термин «Т-клетка» относится к типу лимфоцитов, созревающих в тимусе. Т-клетки играют важную роль в клеточно-опосредованном иммунитете и отличаются от других лимфоцитов, таких как В-клетки, наличием Т-клеточного рецептора на поверхности клетки. Т-клетки могут быть выделены или получены из коммерчески доступного источника. «Т-клетка» включает все типы иммунных клеток, экспрессирующих CD3, включая Т-хелперные клетки (CD4+ клетки), цитотоксические Т-клетки (CD8+ клетки), естественные киллерные Т-клетки, Т-регуляторные клетки (Treg) и гамма-дельта Т-клетки. «Цитотоксическая клетка» включает CD8+ Т-клетки, естественные киллеры (NK) и нейтрофилы, которые способны опосредовать ответы цитотоксичности. Неограничивающие примеры коммерчески доступных линий Т-клеток включают линии BCL2 (AAA) Jurkat (ATCC® CRL-2902™), BCL2 (S70A) Jurkat (ATCC® CRL-2900™), BCL2 (S87A) Jurkat (ATCC® CRL-2901™), BCL2 Jurkat (ATCC® CRL-2899™), Neo Jurkat (ATCC® CRL-2898™), TALL-104 линию цитотоксических Т клеток человека (ATCC # CRL-11386). Другие примеры включают, но не ограничены ими, линии зрелых Т-клеток, например, такие как Deglis, EBT-8, HPB-MLp-W, HUT 78, HUT 102, Karpas 384, Ki 225, My-La, Se-Ax, SKW-3, SMZ-1 и T34; и линии незрелых Т-клеток, например, ALL-SIL, Be13, CCRF-CEM, CML-T1, DND-41, DU.528, EU-9, HD-Mar, HPB-ALL, H-SB2, HT-1, JK-T1, Jurkat, Karpas 45, KE-37, KOPT-K1, K-T1, L-KAW, Loucy, MAT, MOLT-1, MOLT 3, MOLT-4, MOLT 13, MOLT-16, MT-1, MT-ALL, P12/Ichikawa, Peer, PER0117, PER-255, PF-382, PFI-285, RPMI-8402, ST-4, SUP-T1 до T14, TALL-1, TALL-101, TALL-103/2, TALL-104, TALL-105, TALL-106, TALL-107, TALL-197, TK-6, TLBR-1, -2, -3 и -4, CCRF-HSB-2 (CCL-120.1), J.RT3-T3.5 (ATCC TIB-153), J45.01 (ATCC CRL-1990), J.CaM1.6 (ATCC CRL-2063), RS4;11 (ATCC CRL-1873), CCRF-CEM (ATCC CRM-CCL-119); и линии Т-клеток кожной лимфомы, например, HuT78 (ATCC CRM-TIB-161), MJ[G11] (ATCC CRL-8294), HuT102 (ATCC TIB-162). Нулевые клеточные линии лейкоза, включающие, но не ограниченные ими, REH, NALL-1, KM-3, L92-221, являются другие коммерчески доступным источником иммунных клеток, как и клеточные линии, полученные из других лейкозов и лимфом, такие как K562 эритролейкоз, THP-1 моноцитарный лейкоз, U937 лимфома, HEL эритролейкоз, HL60 лейкоз, HMC-1 лейкоз, KG-1 лейкоз, U266 миелома. Неограничивающие типовые источники для таких коммерчески доступных клеточных линий включают American Type Culture Collection или ATCC, (http://www.atcc.org/) и German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (https://www.dsmz.de/).

Используемыt здесь терминs «последовательность нуклеиновой кислоты» и «полинуклеотид» используются взаимозаменяемо для обозначения полимерной формы

нуклеотидов любой длины, либо рибонуклеотидов, либо дезоксирибонуклеотидов. Таким образом, этот термин включает, но не ограничен ими, одно-, двух- или многонитевую ДНК или РНК, геномную ДНК, кДНК, гибриды ДНК-РНК или полимер, содержащий пуриновые и пиримидиновые основания или другие природные, химически или биохимически модифицированные, не природные или дериватизированные нуклеотидные основания.

Термин «белок», «пептид» и «полипептид» используются взаимозаменяемо и в их самом широком смысле для обозначения соединения из двух или более субъединиц аминокислот, аналогов аминокислот или пептидомиметиков. Субъединицы могут быть связаны пептидными связями. В другом аспекте субъединица может быть связана другими связями, например сложным эфиром, простым эфиром и т. д. Белок или пептид должен содержать, по меньшей мере, две аминокислоты, и нет ограничений на максимальное количество аминокислот, которые может включать последовательность белка или пептида. Используемый в настоящем документе термин «аминокислота» относится либо к природным и/или не природным, либо к синтетическим аминокислотам, включая глицин и оба оптических изомера D и L, аналоги аминокислот и пептидомиметики.

Используемый в настоящем документе термин «рекомбинантный белок» относится к полипептиду, который получают методами рекомбинантной ДНК, где обычно ДНК, кодирующую полипептид, вставляют в подходящий вектор экспрессии, который, в свою очередь, используют для трансформации Т-клетки хозяина для получения гетерологичного белка.

Полинуклеотид или область полинуклеотида (или полипептид или область полипептида), имеющая определенную долю (например, 80%, 85%, 90% или 95%) «идентичности последовательности» с другой последовательностью, означает, что при выравнивании эта доля оснований (или аминокислот) совпадает при сравнении двух последовательностей. Выравнивание и доля гомологии или идентичности последовательностей может быть определена с помощью программ, известных в данной области, например, описанных в Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1987) приложение 30, раздел 7.7.18, таблица 7.7.1. Предпочтительно, для выравнивания применяют параметры по умолчанию. Предпочтительной программой для выравнивания является BLAST, применяющая параметры по умолчанию. В частности, предпочтительными программами являются BLASTN и BLASTP, применяющие следующие параметры по умолчанию: генетический код=стандартный; фильтр=нет; цепь=обе; пороговое значение=60; ожидание=10; матрица=BLOSUM62; описания=50 последовательностей; сортировка=HIGH SCORE; базы данных=неизбыточная, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS трансляции+SwissProtein+SPupdate+PIR. Подробное описание этих программ может быть найдено по следующей ссылке Интернет: ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST.

Термины «полинуклеотид» и «олигонуклеотид» используются взаимозаменяемо и

относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, либо дезоксирибонуклеотидов, либо рибонуклеотидов или их аналогов. Полинуклеотиды могут иметь любую трехмерную структуру и могут выполнять любую функцию, известную или неизвестную. Ниже приведены неограничивающие примеры полинуклеотидов: ген или фрагмент гена (например, зонд, праймер, EST или SAGE метка), экзоны, интроны, информационная РНК (иРНК), транспортная РНК, рибосомная РНК, РНКи, рибозимы, кДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенная ДНК любой последовательности, выделенная РНК любой последовательности, зонды и праймеры нуклеиновых кислот. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и аналоги нуклеотидов. Если присутствуют, модификации нуклеотидной структуры могут быть внесены до или после сборки полинуклеотида. Последовательность нуклеотидов может прерываться не нуклеотидными компонентами. Полинуклеотид может быть дополнительно модифицирован после полимеризации, например, конъюгацией с метящим компонентом. Термин также относится и к двухцепочечным, и к одноцепочечным молекулам. Если не указано или не требуется иное, любой аспект этой технологии, который является полинуклеотидом, охватывает и двухцепочечную форму, и каждую из двух комплементарных одноцепочечных форм, которые, известно или вероятно, образуют двухцепочечную форму.

Используемый в настоящем документе термин «экспрессия» относится к процессу, посредством которого полинуклеотиды транскрибируются в иРНК и/или процессу, посредством которого транскрибируемая иРНК впоследствии транслируется в пептиды, полипептиды или белки. Если полинуклеотид получают из геномной ДНК, экспрессия может включать сплайсинг иРНК в эукариотической клетке. Уровень экспрессии гена может быть определен измерением количества иРНК или белка в образце клетки или ткани. В одном аспекте, уровень экспрессии гена из одного образца можно напрямую сравнить с уровнем экспрессии этого гена из контрольного или эталонного образца. В другом аспекте, уровень экспрессии гена из одного образца можно напрямую сравнить с уровнем экспрессии этого гена из того же образца после введения соединения.

Используемый в настоящем документе термин «сверхэкспрессия» относится к клетке, ткани или органу, экспрессирующему белок в количестве, превышающем количество, которое продуцируется в контрольной клетке, контрольной ткани или органе. Сверхэкспрессируемый белок может быть эндогенным для клетки-хозяина или экзогенным для клетки-хозяина.

Используемый в настоящем документе термин «CRISPR» относится к методике сиквенс-специфичных генетических манипуляций, основанной на пути кластеризованных регулярных промежуточных коротких палиндромных повторов. CRISPR может применяться для выполнения редактирования генов и/или регуляции генов, а также для простого направления белков в определенную локацию генома. Редактирование генов относится к типу генной инженерии, при котором нуклеотидную последовательность

целевого полинуклеотида изменяют путем введения делеций, вставок или замещений оснований в полинуклеотидную последовательность. В некоторых аспектах, CRISPR-опосредованное редактирование генов использует пути негомологичного соединения концов (NHEJ) или гомологичной рекомбинации для выполнения редактирования. Генная регуляция относится к увеличению или уменьшению продуцирования определенных генных продуктов, таких как белок или РНК.

Используемый в настоящем документе термин «нРНК» или «направляющая РНК» относится к последовательностям направляющих РНК, используемым для направления на определенные гены для коррекции с использованием методики CRISPR. Методы конструирования нРНК и донорных терапевтических полинуклеотидов для таргетной специфичности хорошо известны в данной области. Например, Doench, J., et al. Nature biotechnology 2014; 32(12):1262-7, Mohr, S. et al. (2016) FEBS Journal 283: 3232-38 и Graham, D., et al. Genome Biol. 2015; 16: 260. нРНК содержат или альтернативно состоит из по существу из, или дополнительно состоит из слитого полинуклеотида, содержащего CRISPR РНК (crРНК) и транс-активирующую CRIPSPR РНК (tracrРНК); или полинуклеотида, содержащего CRISPR РНК (crРНК) и транс-активирующую CRIPSPR РНК (tracrРНК). В некоторых аспектах, нРНК является синтетической (Kelley, M. et al. (2016) J of Biotechnology 233 (2016) 74-83). В настоящем документе биологической эквивалент нРНК включает, но не ограничен ими, полинуклеотиды или таргетные молекулы, которые могут направлять Cas9 или ее эквивалент на определенную нуклеотидную последовательность, такую как определенная область генома клетки.

В настоящем документе термин «консенсусная последовательность» относится к аминокислотной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты, которая определяется выравниванием ряда из множества последовательностей, и которая определяет идеализированную последовательность, которая представляет преимущественный выбор аминокислоты или основания в каждом соответствующем положении множества последовательностей. В зависимости от последовательностей ряда из множества последовательностей, консенсусная последовательность для ряда может отличаться от каждой из последовательностей на ноль, одно, несколько или более замещений. Также, в зависимости от последовательностей ряда из множества последовательностей, более чем одна консенсусная последовательность может быть определена для ряда. Создание консенсусных последовательностей подвергалось интенсивному математическому анализу. Разное программное обеспечение может применяться для определения консенсусной последовательности.

Термин «кодировать», когда он применяется к последовательностям нуклеиновых кислот, относится к полинуклеотиду, который, как говорят, «кодирует» полипептид если его, в природном состоянии или при проведении манипуляций способами, хорошо известными специалистам в данной области, может быть транскрибирован и/или транслирован для получения иРНК для полипептида и/или его фрагмента. Антисмысловая цепь представляет собой комплемент такой нуклеиновой кислоты, и кодирующая

последовательность может быть выведена из нее.

Как применяется в настоящем документе в отношении регуляторного полинуклеотида, термин «функционально связанный» относится к ассоциации между регуляторным полинуклеотидом и полинуклеотидной последовательностью, с которой он связан, так что, когда конкретный белок связывается с регуляторным полинуклеотидом, связанный полинуклеотид транскрибируется.

Регуляторные последовательности или элементы включают промоторы, энхансер и/или комбинации промотор/энхансер. Промотором, регулирующим экспрессию кодирующих нуклеиновых кислот, может быть конститутивный промотор. Неограничивающие примеры конститутивных промоторов включают SFFV, CMV, PKG, MDNU3, SV40, Ef1a, UBC и CAGG. В одном аспекте, энхансером является пост-регуляторный элемент Woodchuck («WPRE») (см., например, Zufferey, R. et al. (1999) J. Virol. 73(4):2886-2992). Энхансерный элемент может быть расположен ниже промотора.

Термин «промотор» в контексте настоящего описания относится к любой последовательности, которая регулирует экспрессию кодирующей последовательности, такой как ген. Промоторы могут быть конститутивными, индуцируемыми, репрессируемыми или тканеспецифичными, например. «Промотор» - это контрольная последовательность, представляющая собой область полинуклеотидной последовательности, в которой контролируется инициация и скорость транскрипции. Он может содержать генетические элементы, с которыми могут связываться регуляторные белки и молекулы, такие как РНК-полимераза и другие факторы транскрипции.

Используемый в настоящем документе термин «промотор» относится к любой последовательности, которая регулирует экспрессию кодирующей последовательности, такой как ген. Промоторы могут быть конститутивными, индуцируемыми, репрессируемыми или ткань-специфичными, например. «Промотором» является контрольная последовательность, представляющая собой область полинуклеотидной последовательности, в которой контролируется инициация и скорость транскрипции. Он может содержать генетические элементы, с которыми могут связываться регуляторные белки и молекулы, такие как РНК полимераза и другие факторы транскрипции.

Используемый в настоящем документе термин «энхансер», означает элементы последовательности, которые усиливают, улучшают или облегчают транскрипцию последовательности нуклеиновой кислоты, независимо от ее локации и ориентации по отношению к экспрессируемой последовательности нуклеиновой кислоты. Энхансер может усиливать транскрипцию из одного промотора или одновременно из более чем одного промотора. Пока эта функция улучшения транскрипции сохраняется или по существу сохраняется (например, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90% или по меньшей мере, 95% от активности дикого типа, то есть, активности полноразмерной последовательности), любые усеченные, мутированные или иным образом модифицированные варианты последовательности энхансера дикого типа также подпадают под определение, приведенное выше.

Используемые в настоящем документе термины «гомология» или «идентичный», доля «идентичности» или «сходства» при использовании в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей, относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые идентичны или имеют указанную долю одинаковых нуклеотидов или аминокислотных остатков, например, по меньшей мере, 60% идентичности, предпочтительно, по меньшей мере, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91% , 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более высокую идентичность в определенной области (например, нуклеотидной последовательности, кодирующей описанное здесь антитело, или аминокислотной последовательности антитела, описанного здесь). Гомология может быть определена сравнением положения в каждой последовательности, которая может быть выровнена для целей сравнения. Когда положение в сравниваемой последовательности занято одним и тем же основанием или аминокислотой, молекулы гомологичны в этом положении. Степень гомологии между последовательностями является функцией количества совпадающих или гомологичных положений, общих для последовательностей. Выравнивание и долю гомологии или идентичности последовательностей можно определить с помощью программ, известных в данной области, например, описанных в Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1987) приложение 30, раздел 7.7.18, таблица 7.7.1. Предпочтительно, для выравнивания применяют параметры по умолчанию. Предпочтительной программой для выравнивания является BLAST, применяющая параметры по умолчанию. В частности, предпочтительными программами являются BLASTN и BLASTP, применяющие следующие параметры по умолчанию: генетический код=стандартный; фильтр=нет; цепь=обе; пороговое значение=60; ожидание=10; матрица=BLOSUM62; описания=50 последовательностей; сортировка=HIGH SCORE; базы данных=неизбыточная, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS трансляции+SwissProtein+SPupdate+PIR. Подробное описание этих программ может быть найдено по следующей ссылке Интернет: ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST. Термин «гомология» или «идентичный», доля «идентичности» или «сходства» также относятся или могут применяться к комплементу тестируемой последовательности. Термины также включают последовательности, которые имеют делеции и/или добавления, а также такие, которые имеют замещения. Как описано в настоящем документе, предпочтительные алгоритмы могут учитываться для гэпов и подобных. Предпочтительно, идентичность существует в пределах области, которая имеет, по меньшей мере, примерно 25 аминокислот или нуклеотидов в длину, или более предпочтительно, в пределах области, которая имеет, по меньшей мере, 50-100 аминокислот или нуклеотидов в длину. «Не родственная» или «не гомологичная» последовательность имеет менее 40% идентичности или, альтернативно, менее 25% идентичности с одной из последовательностей, раскрытых в настоящем документе.

«Гибридизация» относится к реакции, в которой один или более полинуклеотидов реагируют с образованием комплекса, который стабилизируется за счет водородной связи между основаниями нуклеотидных остатков. Водородное связывание может происходить

путем спаривания оснований Уотсона-Крика, связывания Хугштейна или любым другим сиквенс-специфичным способом. Комплекс может включать две цепи, образующие дуплексную структуру, три или более цепей, образующих многоцепочечный комплекс, одну самогибридизирующуюся цепь или любую их комбинацию. Реакция гибридизации может составлять стадию более длительного процесса, такого как инициация реакции ПЦР или ферментативное расщепление полинуклеотида рибозимом.

Примеры жестких условий гибридизации включают: температуры инкубации от примерно 25°C до примерно 37°C; концентрации буфера для гибридизации от примерно 6x SSC до 10x SSC; концентрации формамида от примерно 0% до примерно 25%; и промывочные растворы от примерно 4x SSC до примерно 8x SSC. Примеры умеренных условий гибридизации включают: температуры инкубации от примерно 40°C до примерно 50°C; концентрации буфера от примерно 9x SSC до примерно 2x SSC; концентрации формамида от примерно 30% до примерно 50%; и промывочные растворы от примерно 5x SSC до примерно 2x SSC. Примеры условий высокой жесткости включают: температуры инкубации от примерно 55°C до примерно 68°C; концентрации буфера от примерно 1x SSC до примерно 0,1x SSC; концентрации формамида от примерно 55% до примерно 75%; и промывочные растворы примерно 1x SSC, 0,1x SSC или деионизированная вода. Как правило, время инкубации гибридизации составляет от 5 минут до 24 часов, с 1, 2 или несколькими стадиями промывки, и время инкубации с промывкой составляет примерно 1, 2 или 15 минут. SSC представляет собой 0,15 M NaCl и 15 мМ цитратный буфер. Понятно, что можно использовать эквиваленты SSC с использованием других буферных систем.

Используемый в настоящем документе термин «иммунорегуляторная молекула» может относиться к любой молекуле, которая может регулировать или напрямую влиять на иммунные ответы, включая, но не ограничиваясь ими, хемокины, такие как CCL2, CCL5, CCL14, CCL19, CCL20, CXCL8, CXCL13 и LEC; лимфокины и цитокины, такие как интерлейкины (например, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 и т.д.), интерфероны α, β и γ, факторы, стимулирующие рост клеток (например, GM-CSF) и другие факторы (например, факторы некроза опухоли, DC-SIGN, MlPlα, MlPlβ, TGF-β или TNF); факторы, которые обеспечивают костимулирующие сигналы для активации Т-клеток, такие как B7 молекулы и CD40; вспомогательные молекулы, такие как CD83; белки, вовлеченные в процессирование и презентирование антигена, такие как TAP1/TAP2 транспортерные белки, молекулы протеосомы, такие как LMP2 и LMP7, белки теплового шока, такие как gp96, HSP70 и HSP90 и MHC или HLA молекулы; и их биологические эквиваленты. Неограничивающие примеры иммунорегуляторных молекул раскрыты в настоящем документе.

Используемый в настоящем документе термин «B7.1» (также известный как B7; BB1; B7-1; CD80; LAB7; CD28LG; CD28LG1) относится к определенной молекуле, ассоциированной с этим наименованием, и любым другим молекулам, которые имеют аналогичную биологическую функцию, которая имеет, по меньшей мере, 80%

идентичность аминокислотной последовательности, предпочтительно, 90% идентичность последовательности, более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичность последовательности с B7.1. Примеры B7.1 последовательности представлены в настоящем документе. Кроме того, последовательности, ассоциированные с номерами доступа GenBank NM_005191.3 и NP_005182.1 являются типовыми. Неограничивающий пример включает NP_005182.1:

MGHTRRQGTS PSKCPYLNFF QLLVLAGLSH FCSGVIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIYWQKEK KMVLTMMSGD MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILALRPSD EGTYECVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA DFPTPSISDF EIPTSNIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS QDPETELYAV SSKLDFNMTT NHSFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DNLLPSWAIT LISVNGIFVI CCLTYCFAPR CRERRRNERL RRESVRPV

В некоторых вариантах осуществления, где B7.1 вводят как часть композиции, он может быть либо синтезирован, либо приобретен из любого доступного коммерческого источника. К таким источникам относятся Santa Cruz Biosciences, Origene и другие продавцы очищенных белков и их модифицированных версий. Список коммерческих источников можно найти на Linscott's Directory of Immunological & Biological Reagents (http://www.linscottsdirectory.com/).

Используемый в настоящем документе термин «CCL19» (также известный как ELC; CKb11; MIP3B; MIP-3b; SCYA19) относится к определенной молекуле, ассоциированной с этим названием, и к любым другим молекулам с аналогичной биологической функцией, которые имеют, по меньшей мере, 80% идентичность аминокислотной последовательности, предпочтительно, 90% идентичность последовательности, более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичность последовательности с CCL19. Примеры последовательности CCL19 представлены в настоящем документе. Кроме того, последовательности, ассоциированные с номерами доступа GenBank NC_000009.11 NC_018920.2 NT_008413.19, NP_006265.1 являются типовыми. Неограничивающий пример включает NP_006265.1:

MALLLALSLL VLWTSPAPTL SGTNDAEDCC LSVTQKPIPG YIVRNFHYLL IKDGCRVPAV VFTTLRGRQL CAPPDQPWVE RIIQRLQRTS AKMKRRSS

В некоторых вариантах осуществления, где CCL19 вводят как часть композиции, он может быть либо синтезирован, либо приобретен из любого доступного коммерческого источника. К таким источникам относятся Santa Cruz Biosciences, Origene и другие продавцы очищенных белков и их модифицированных версий. Список коммерческих источников можно найти на Linscott's Directory of Immunological & Biological Reagents (http://www.linscottsdirectory.com/).

Используемый в настоящем документе термин «CCL20» (также известный как CKb4; LARC; ST38; MIP3A; Exodus; MIP-3a; SCYA20; MIP-3-альфа) относится к определенной молекуле, ассоциированной с этим названием, и к любым другим молекулам с аналогичной биологической функцией, которые имеют, по меньшей мере,

80% идентичность аминокислотной последовательности, предпочтительно, 90% идентичность последовательности, более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичность последовательности с CCL20. Примеры последовательности CCL20 представлены в настоящем документе. Кроме того, последовательности, ассоциированные с номерами доступа GenBank NC_000002.11 NC_018913.2 NT_005403.18 , NP_001123518.1 и NP_004582.1 являются типовыми. Неограничивающий пример включает NP_004582.1:

MCCTKSLLLA ALMSVLLLHL CGESEAASNF DCCLGYTDRI LHPKFIVGFT RQLANEGCDI NAIIFHTKKK LSVCANPKQT WVKYIVRLLS KKVKNM

и NP_001123518.1:

MCCTKSLLLA ALMSVLLLHL CGESEASNFD CCLGYTDRIL HPKFIVGFTR QLANEGCDIN AIIFHTKKKL SVCANPKQTW VKYIVRLLSK KVKNM

В некоторых вариантах осуществления, где CCL20 вводят как часть композиции, он может быть либо синтезирован, либо приобретен из любого доступного коммерческого источника. К таким источникам относятся Santa Cruz Biosciences, Origene и другие продавцы очищенных белков и их модифицированных версий. Список коммерческих источников можно найти на Linscott's Directory of Immunological & Biological Reagents (см. сетевой адрес: linscottsdirectory.com, последний доступ 20 июня 2019).

Используемый в настоящем документе термин «CD40L» (также известный как IGM; IMD3; TRAP; gp39; CD154; CD40LG; HIGM1; T-BAM; TNFSF5; hCD40L) относится к определенной молекуле, ассоциированной с этим названием, и к любым другим молекулам с аналогичной биологической функцией, которые имеют, по меньшей мере, 80% идентичность аминокислотной последовательности, предпочтительно, 90% идентичность последовательности, более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичность последовательности с CD40L. Примеры последовательности CD40L представлены в настоящем документе. Кроме того, последовательности, ассоциированные с номерами доступа GenBank NC_000023.10, NC_018934.2, NT_011786.17, NP_000065.1 являются типовыми. Неограничивающий пример включает NP_000065.1:

MIETYNQTSP RSAATGLPIS MKIFMYLLTV FLITQMIGSA LFAVYLHRRL DKIEDERNLH EDFVFMKTIQ RCNTGERSLS LLNCEEIKSQ FEGFVKDIML NKEETKKENS FEMQKGDQNP QIAAHVISEA SSKTTSVLQW AEKGYYTMSN NLVTLENGKQ LTVKRQGLYY IYAQVTFCSN REASSQAPFI ASLCLKSPGR FERILLRAAN THSSAKPCGQ QSIHLGGVFE LQPGASVFVN VTDPSQVSHG TGFTSFGLLK L

В некоторых вариантах осуществления, где CD40L вводят как часть композиции, он может быть либо синтезирован, либо приобретен из любого доступного коммерческого источника. К таким источникам относятся Santa Cruz Biosciences, Origene и другие продавцы очищенных белков и их модифицированных версий. Список коммерческих источников можно найти на Linscott's Directory of Immunological & Biological Reagents (см. сетевой адрес: linscottsdirectory.com, последний доступ 20 июня 2019).

Используемый в настоящем документе термин «CD137L» (также известный как

TNFSF9; 4-1BB-L) относится к определенной молекуле, ассоциированной с этим названием, и к любым другим молекулам с аналогичной биологической функцией, которые имеют, по меньшей мере, 80% идентичность аминокислотной последовательности, предпочтительно, 90% идентичность последовательности, более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичность последовательности с CD137L. Примеры последовательности CD137L представлены в настоящем документе. Кроме того, последовательности, ассоциированные с номерами доступа GenBank NC_000019.9, NT_011295.12, NC_018930.2 и NP_003802.1 являются типовыми. Неограничивающий пример включает NP_003802.1:

MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL LAAACAVFLA CPWAVSGARA SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE

В некоторых вариантах осуществления, где CD137L вводят как часть композиции, он может быть либо синтезирован, либо приобретен из любого доступного коммерческого источника. К таким источникам относятся Santa Cruz Biosciences, Origene и другие продавцы очищенных белков и их модифицированных версий. Список коммерческих источников можно найти на Linscott's Directory of Immunological & Biological Reagents (см. сетевой адрес: linscottsdirectory.com, последний доступ 20 июня 2019).

Используемый в настоящем документе термин «GITRL» (также известный как TNFSF18; TL6; AITRL; hGITRL) относится к определенной молекуле, ассоциированной с этим названием, и к любым другим молекулам с аналогичной биологической функцией, которые имеют, по меньшей мере, 80% идентичность аминокислотной последовательности, предпочтительно, 90% идентичность последовательности, более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичность последовательности с GITRL. Примеры последовательности GITRL представлены в настоящем документе. Кроме того, последовательности, ассоциированные с номерами доступа GenBank NC_000001.10, NC_018912.2, NT_004487.20 и NP_005083.2 являются типовыми. Неограничивающий пример включает NP_005083.2:

MTLHPSPITC EFLFSTALIS PKMCLSHLEN MPLSHSRTQG AQRSSWKLWL FCSIVMLLFL CSFSWLIFIF LQLETAKEPC MAKFGPLPSK WQMASSEPPC VNKVSDWKLE ILQNGLYLIY GQVAPNANYN DVAPFEVRLY KNKDMIQTLT NKSKIQNVGG TYELHVGDTI DLIFNSEHQV LKNNTYWGII LLANPQFIS

В некоторых вариантах осуществления, где GITRL вводят как часть композиции, он может быть либо синтезирован, либо приобретен из любого доступного коммерческого источника. К таким источникам относятся Santa Cruz Biosciences, Origene и другие продавцы очищенных белков и их модифицированных версий. Список коммерческих источников можно найти на Linscott's Directory of Immunological & Biological Reagents (см. сетевой адрес: linscottsdirectory.com, последний доступ 20 июня 2019).

Используемый в настоящем документе термин «GM-CSF» (также известный как гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; CSF2) относится к определенной молекуле, ассоциированной с этим названием, и к любым другим молекулам с аналогичной биологической функцией, которые имеют, по меньшей мере, 80% идентичность аминокислотной последовательности, предпочтительно, 90% идентичность последовательности, более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичность последовательности с GM-CSF. Примеры последовательности GM-CSF представлены в настоящем документе. Кроме того, белковые последовательности, ассоциированные со ссылочным номером UniProt P04141 - CSF2_HUMAN:

MWLQSLLLLG TVACSISAPA RSPSPSTQPW EHVNAIQEAR RLLNLSRDTA AEMNETVEVI SEMFDLQEPT CLQTRLELYK QGLRGSLTKL KGPLTMMASH YKQHCPPTPE TSCATQIITF ESFKENLKDF LLVIPFDCWE PVQE

В некоторых вариантах осуществления, где GM-CSF вводят как часть композиции, он может быть либо синтезирован, либо приобретен из любого доступного коммерческого источника. К таким источникам относятся Santa Cruz Biosciences, Origene и другие продавцы очищенных белков и их модифицированных версий. Список коммерческих источников можно найти на Linscott's Directory of Immunological & Biological Reagents (http://www.linscottsdirectory.com).

Используемый в настоящем документе термин «IL-12» (также известный как «интерлейкин 12») относится к определенной молекуле, ассоциированной с этим названием, и к любым другим молекулам с аналогичной биологической функцией, которые имеют, по меньшей мере, 80% идентичность аминокислотной последовательности, предпочтительно, 90% идентичность последовательности, более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичность последовательности с IL-12. Примеры IL-12 последовательности представлены в настоящем документе и включают, но не ограничены ими, зрелую форму IL-12 и ее варианты и фрагменты, такие как одноцепочечный IL-12, IL-12A (номера доступа GenBank NC_000003.11 NT_005612.17 NC_018914.2) и IL-12B (номера доступа GenBank NC_000005.9 NC_018916.2 NT_023133.14). Белковые последовательности, связанные с последовательностями, раскрытыми в патенте США № 8,556,882, являются типовыми. В некоторых вариантах осуществления, где IL-12 вводят как часть композиции, он может быть либо синтезирован, либо приобретен из любого доступного коммерческого источника. К таким источникам относятся Santa Cruz Biosciences, Origene и другие продавцы очищенных белков и их модифицированных версий. Список коммерческих источников можно найти на Linscott's Directory of Immunological & Biological Reagents (http://www.linscottsdirectory.com).

Используемый в настоящем документе термин «IL-2» (также называемый «интерлейкин 2») относится к определенной молекуле, ассоциированной с этим названием, и к любым другим молекулам с аналогичной биологической функцией, которые имеют, по меньшей мере, 80% идентичность аминокислотной

последовательности, предпочтительно, 90% идентичность последовательности, более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичность последовательности с IL-2. Неограничивающий пример ниже представляет полноразмерную последовательность нативного человеческого IL-2: APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT

Термин «низкотоксичный IL-2» относится к модифицированной версии IL-2, демонстрирующей аналогичную биологическую функцию, но меньшую токсичность при введении субъекту. В некоторых вариантах осуществления, низкотоксичный IL-2 содержит мутацию с пониженной проницаемостью сосудов по сравнению с IL-2 жидкого типа. В патенте США № 7,371,371 описаны типовые мутации в улучшающей проницаемость области IL-2 дикого типа между аминокислотными положениями 22-58 IL-2 человека. Неограничивающие примеры включают мутацию R на W в положении 38 последовательности человека. В патенте США № 7,371,371 дополнительно раскрыт низкотоксичный IL-2, содержащий мутацию в одном или нескольких положениях вне улучшающей проницаемости области IL-2.

Используемый в настоящем документе термин «IL-15» (также известный как «интерлейкин 15») относится к определенной молекуле, ассоциированной с этим названием, и к любым другим молекулам с аналогичной биологической функцией, которые имеют, по меньшей мере, 80% идентичность аминокислотной последовательности, предпочтительно, 90% идентичность последовательности, более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичность последовательности с IL-15. Примеры последовательности IL-15 представлены в настоящем документе. Кроме того, последовательности, ассоциированные с номерами доступа GenBank NC_000004.11, NC_018915.2, NT_016354.20, NP_000576.1, NP_751915.1 являются типовыми. В некоторых вариантах осуществления, где IL-15 вводят как часть композиции, он может быть либо синтезирован, либо приобретен из любого доступного коммерческого источника. К таким источникам относятся Santa Cruz Biosciences, Origene и другие продавцы очищенных белков и их модифицированных версий. Список коммерческих источников можно найти на Linscott's Directory of Immunological & Biological Reagents (см. linscottsdirectory.com, отмеченный выше).

Используемый в настоящем документе термин «IL-18» (также известный как «интерлейкин 18,» IGIF, «интерлейкин 1 гамма», IL1F4, IFN-Гамма-индуцирующий фактор, IL-1g,) относится к определенной молекуле, ассоциированной с этим названием, и к любым другим молекулам с аналогичной биологической функцией, которые имеют, по меньшей мере, 80% идентичность аминокислотной последовательности, предпочтительно, 90% идентичность последовательности, более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичность последовательности с IL-18. Примеры последовательности IL-18 представлены в настоящем документе. Кроме того, последовательности, ассоциированные с номерами доступа GenBank NC_000011.9, NC_018922.2, NT_033899.9, NP_001230140.1,

NP_001553.1 являются типовыми. В некоторых вариантах осуществления, где IL-18 вводят как часть композиции, он может быть либо синтезирован, либо приобретен из любого доступного коммерческого источника. К таким источникам относятся Santa Cruz Biosciences, Origene и другие продавцы очищенных белков и их модифицированных версий. Список коммерческих источников можно найти на Linscott's Directory of Immunological & Biological Reagents (см. linscottsdirectory.com, отмеченный выше).

Используемый в настоящем документе термин «IL-21» (также известный как «интерлейкин 21»; Za11; CVID11) относится к определенной молекуле, ассоциированной с этим названием, и к любым другим молекулам с аналогичной биологической функцией, которые имеют, по меньшей мере, 80% идентичность аминокислотной последовательности, предпочтительно, 90% идентичность последовательности, более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичность последовательности с IL-21. Примеры последовательности IL-21 представлены в настоящем документе. Кроме того, последовательности, ассоциированные с номерами доступа GenBank NC_000004.11, NC_018915.2, NT_016354.20, являются типовыми. В некоторых вариантах осуществления, где IL-21 вводят как часть композиции, он может быть либо синтезирован, либо приобретен из любого доступного коммерческого источника. К таким источникам относятся Santa Cruz Biosciences, Origene и другие продавцы очищенных белков и их модифицированных версий. Список коммерческих источников можно найти на Linscott's Directory of Immunological & Biological Reagents (см. linscottsdirectory.com, отмеченный выше).

Используемый в настоящем документе термин «LEC» (также известный как CCL16; LMC; NCC4; CKb12; HCC-4; LCC-1; Mtn-1; NCC-4; SCYL4; ILINCK; SCYA16) относится к определенной молекуле, ассоциированной с этим названием, и к любым другим молекулам с аналогичной биологической функцией, которые имеют, по меньшей мере, 80% идентичность аминокислотной последовательности, предпочтительно, 90% идентичность последовательности, более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичность последовательности с LEC. Примеры последовательности LEC представлены в настоящем документе. Кроме того, последовательности, ассоциированные с номерами доступа GenBank NC_000017.10, NT_010783.16, NT_187614.1, NC_018928.2, NP_004581.1 являются типовыми. Неограничивающий пример включает NP_004581.1: MKVSEAALSL LVLILIITSA SRSQPKVPEW VNTPSTCCLK YYEKVLPRRL VVGYRKALNC HLPAIIFVTK RNREVCTNPN DDWVQEYIKD PNLPLLPTRN LSTVKIITAK NGQPQLLNSQ

В некоторых вариантах осуществления, где LEC вводят как часть композиции, он может быть либо синтезирован, либо приобретен из любого доступного коммерческого источника. К таким источникам относятся Santa Cruz Biosciences, Origene и другие продавцы очищенных белков и их модифицированных версий. Список коммерческих источников можно найти на Linscott's Directory of Immunological & Biological Reagents (см. linscottsdirectory.com, отмеченный выше).

Используемый в настоящем документе термин «OX40L» (также известный как TNFSF4; GP34; CD252; TXGP1; CD134L; OX-40L) относится к определенной молекуле, ассоциированной с этим названием, и к любым другим молекулам с аналогичной биологической функцией, которые имеют, по меньшей мере, 80% идентичность аминокислотной последовательности, предпочтительно, 90% идентичность последовательности, более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичность последовательности с OX40L. Примеры последовательности OX40L представлены в настоящем документе. Кроме того, последовательности, ассоциированные с номерами доступа GenBank NC_000001.10, NT_004487.20, NC_018912.2, NP_003317.1 являются типовыми.

Неограничивающий пример включает NP_003317.1: MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYFS QEVNISLHYQ KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF CVL

В некоторых вариантах осуществления, где OX40L вводят как часть композиции, он может быть либо синтезирован, либо приобретен из любого доступного коммерческого источника. К таким источникам относятся Santa Cruz Biosciences, Origene и другие продавцы очищенных белков и их модифицированных версий. Список коммерческих источников можно найти на Linscott's Directory of Immunological & Biological Reagents (см. linscottsdirectory.com, отмеченный выше).

Используемый в настоящем документе термин «FLT3» относится к тирозинпротеинкиназе рецепторного типа FLT3, ассоциированной с эти наименованием, любому из ее альтернативных наименований (Fms-ростенная тирозинкиназа, Тирозинкиназа стволовых клеток, Fms-подобная тирозинкиназа, FL Цитокиновый рецептор, CD135 антиген, EC 2.7.10.1, CD135, FLK-2, STK1, FLK2, Рецепторная тирозинкиназа фактора роста III типа, Тирозинпротеинкиназа рецепторного типа FLT3, Киназа печени зародыша 2, Киназа печени зародыша-2, EC 2.7.10 , FLT-3, STK-1) или номер доступа UniProt P36888 и к любым другим молекулам с аналогичной биологической функцией, которые имеют, по меньшей мере, 80% идентичность аминокислотной последовательности, предпочтительно, 90% идентичность последовательности, более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичность последовательности с FLT3 и любым ее вариантом или изоформой. Неорганичивающие примеры FLT3 включают:

FLT3 изоформу 1 человека,

MPALARDGGQLPLLVVFSAMIFGTITNQDLPVIKCVLINHKNNDSSVGKSSSYPM VSESPEDLGCALRPQSSGTVYEAAAVEVDVSASITLQVLVDAPGNISCLWVFKHSSLNC QPHFDLQNRGVVSMVILKMTETQAGEYLLFIQSEATNYTILFTVSIRNTLLYTLRRPYFR KMENQDALVCISESVPEPIVEWVLCDSQGESCKEESPAVVKKEEKVLHELFGTDIRCCA RNELGRECTRLFTIDLNQTPQTTLPQLFLKVGEPLWIRCKAVHVNHGFGLTWELENKAL

EEGNYFEMSTYSTNRTMIRILFAFVSSVARNDTGYYTCSSSKHPSQSALVTIVEKGFINAT
NSSEDYEIDQYEEFCFSVRFKAYPQIRCTWTFSRKSFPCEQKGLDNGYSISKFCNHKHQP
GEYIFHAENDDAQFTKMFTLNIRRKPQVLAEASASQASCFSDGYPLPSWTWKKCSDKSP
NCTEEITEGVWNRKANRKVFGQWVSSSTLNMSEAIKGFLVKCCAYNSLGTSCETILLNS
PGPFPFIQDNISFYATIGVCLLFIVVLTLLICHKYKKQFRYESQLQMVQVTGSSDNEYFYV
DFREYEYDLKWEFPRENLEFGKVLGSGAFGKVMNATAYGISKTGVSIQVAVKMLKEKA
DSSEREALMSELKMMTQLGSHENIVNLLGACTLSGPIYLIFEYCCYGDLLNYLRSKREKF
HRTWTEIFKEHNFSFYPTFQSHPNSSMPGSREVQIHPDSDQISGLHGNSFHSEDEIEYENQ
KRLEEEEDLNVLTFEDLLCFAYQVAKGMEFLEFKSCVHRDLAARNVLVTHGKVVKICD
FGLARDIMSDSNYVVRGNARLPVKWMAPESLFEGIYTIKSDVWSYGILLWEIFSLGVNP
YPGIPVDANFYKLIQNGFKMDQPFYATEEIYIIMQSCWAFDSRKRPSFPNLTSFLGCQLA
DAEEAMYQNVDGRVSECPHTYQNRRPFSREMDLGLLSPQAQVEDS и необязательно ее эквивалент.

FLT3 изоформу 2 человека:

MPALARDGGQLPLLVVFSAMIFGTITNQDLPVIKCVLINHKNNDSSVGKSSSYPM
VSESPEDLGCALRPQSSGTVYEAAAVEVDVSASITLQVLVDAPGNISCLWVFKHSSLNC
QPHFDLQNRGVVSMVILKMTETQAGEYLLFIQSEATNYTILFTVSIRNTLLYTLRRPYFR
KMENQDALVCISESVPEPIVEWVLCDSQGESCKEESPAVVKKEEKVLHELFGTDIRCCA
RNELGRECTRLFTIDLNQTPQTTLPQLFLKVGEPLWIRCKAVHVNHGFGLTWELENKAL
EEGNYFEMSTYSTNRTMIRILFAFVSSVARNDTGYYTCSSSKHPSQSALVTIVEKGFINAT
NSSEDYEIDQYEEFCFSVRFKAYPQIRCTWTFSRKSFPCEQKGLDNGYSISKFCNHKHQP
GEYIFHAENDDAQFTKMFTLNIRRKPQVLAEASASQASCFSDGYPLPSWTWKKCSDKSP
NCTEEITEGVWNRKANRKVFGQWVSSSTLNMSEAIKGFLVKCCAYNSLGTSCETILLNS
PGPFPFIQDNISFYATIGVCLLFIVVLTLLICHKYKKQFRYESQLQMVQVTGSSDNEYFYV
DFREYEYDLKWEFPRENLEFGKVLGSGAFGKVMNATAYGISKTGVSIQVAVKMLKEKA
DSSEREALMSELKMMTQLGSHENIVNLLGACTLSGPIYLIFEYCCYGDLLNYLRSKREKF
HRTWTEIFKEHNFSFYPTFQSHPNSSMPGSREVQIHPDSDQISGLHGNSFHSEDEIEYENQ
KRLEEEEDLNVLTFEDLLCFAYQVAKGMEFLEFKSARLPVKWMAPESLFEGIYTIKSDV
WSYGILLWEIFSLGVNPYPGIPVDANFYKLIQNGFKMDQPFYATEEIYIIMQSCWAFDSR
KRPSFPNLTSFLGCQLADAEEAMYQNVDGRVSECPHTYQNRRPFSREMDLGLLSPQAQ
VEDS и необязательно ее эквивалент.

Используемый в настоящем документе термин FLT3-1 относится к антителу, содержащему аминокислотную последовательность с CDR, которые имеют, по меньшей мере, 70%, или альтернативно, по меньшей мере, 80% идентичность аминокислотной последовательности, предпочтительно, 90% идентичность последовательности, более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичность последовательности с любой из CDR, кодированных в полинуклеотидных последовательностях тяжелой и легкой цепей, раскрытых в настоящем документе ниже, предпочтительно, по меньшей мере, одной из CDR3 областей, наиболее предпочтительно, обеих CDR3 областях, описанных ниже. Аминокислотные последовательности указанных областей CDR также раскрыты в

настоящем документе ниже.

Последовательность FLT3-1 переменной области тяжелой цепи:

CAGGTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTTGTGAAGCCTGGGGCTTCAT
TGAAGCTGTCCTGCAAGTCTTCCGGGTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGG
TGAGGCAGAGGCCTGGACATGGCCTTGAGTGGATCGGAGAGATTGATCCTTCTGAC
AGTTATAAAGACTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTGGACAG
ATCCTCCAACACAGCCTACATGCACCTCAGCAGCCTGACATCTGATGACTCTGCGGT
CTATTATTGTGCAAGAGCGATTACGACGACCCCCTTTGACTTCTGGGGCCAAGGCAC
CACTCTCACAGTCTCCTCA и необязательно ее эквивалент.

Последовательность FLT3-1 переменной области легкой цепи:

GATATTGTGCTAACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGATAG
CGTCAGTCTTTCCTGCAGGGCCAGCCAGAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTATCA
ACAAAAATCACATGAGTCTCCAAGGCTTCTCATCAAGTATGCTTCCCAGTCCATCTC
TGGGATCCCCTCCAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCTCAGTAT
CAACAGTGTGGAGACTGAAGATTTTGGAGTGTATTTCTGTCAACAGAGTAACACCTG
GCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG и необязательно ее эквивалент.

FLT3-1 CDHR1: SYWMH и необязательно ее эквивалент.

FLT3-1 CDHR2: EIDPSDSYKDYNQKFKD и необязательно ее эквивалент.

FLT3-1 CDHR3: AITTTPFDF и необязательно ее эквивалент.

FLT3-1 CDLR1: RASQSISNNLH и необязательно ее эквивалент.

FLT3-1 CDLR2: YASQSIS и необязательно ее эквивалент.

FLT3-1 CDLR3: QQSNTWPYT и необязательно ее эквивалент.

Используемый в настоящем документе термин FLT3-2 относится к антителу, содержащему аминокислотную последовательность с CDR, которые имеют, по меньшей мере, 70%, или альтернативно, по меньшей мере, 80% идентичность аминокислотной последовательности, предпочтительно, 90% идентичность последовательности, более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичность последовательности с любой из CDR, кодированных в полинуклеотидных последовательностях тяжелой и легкой цепей, раскрытых в настоящем документе ниже, предпочтительно, по меньшей мере, одной из CDR3 областей, наиболее предпочтительно, обеих CDR3 областях, описанных ниже. Аминокислотные последовательности указанных областей CDR также раскрыты в настоящем документе ниже.

Последовательность FLT3-2 переменной области тяжелой цепи:

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCC
TGTCCATCACCTGCACAGTCTCTGGTTTCTCATTAACTAACTATGGTTTACACTGGGT
TCGCCAGTCTCCAGGAAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGAGTGATATGGAGTGGTGGAA
GCACAGACTATAATGCAGCTTTCATATCCAGACTGAGCATCAGCAAGGACAACTCC
AAGAGCCAAGTTTTCTTTAAAATGAACAGTCTGCAGGCTGATGACACAGCCATATAC
TACTGTGCCAGAAAAGGAGGGATCTACTATGCTAACCATTACTATGCTATGGACTAC

TGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA и необязательно ее эквивалент.

Последовательность FLT3-2 переменной области легкой цепи:

GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGAGTGTGTCAGCAGGAGAGA AGGTCACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAAACAGTGGAAATCAAAAG AACTATATGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCTAAACTGTTGATCTAC GGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGG AACCGATTTCACTCTTACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTA CTGTCAGAATGATCATAGTTATCCGCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCT GAAACGG и необязательно ее эквивалент.

FLT3-2 CDHR1: NYGLH и необязательно ее эквивалент.

FLT3-2 CDHR2: VIWSGGSTDYNAAFIS и необязательно ее эквивалент.

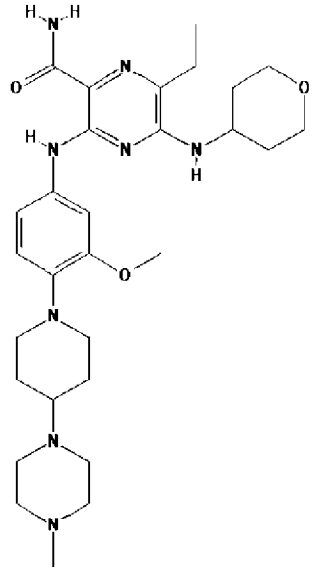
FLT3-2 CDHR3: GGIYYANHYYAMDY и необязательно ее эквивалент.

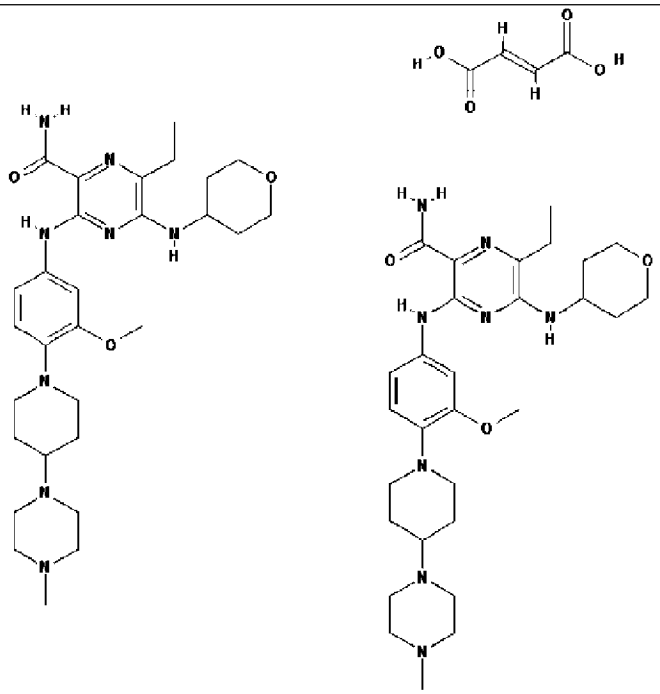
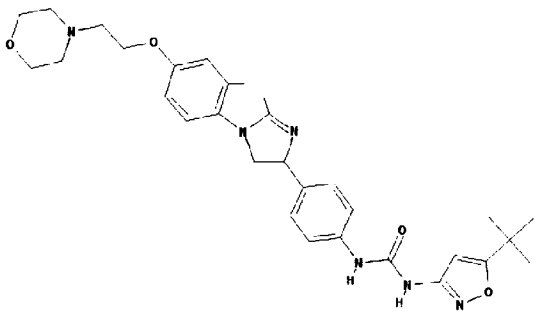
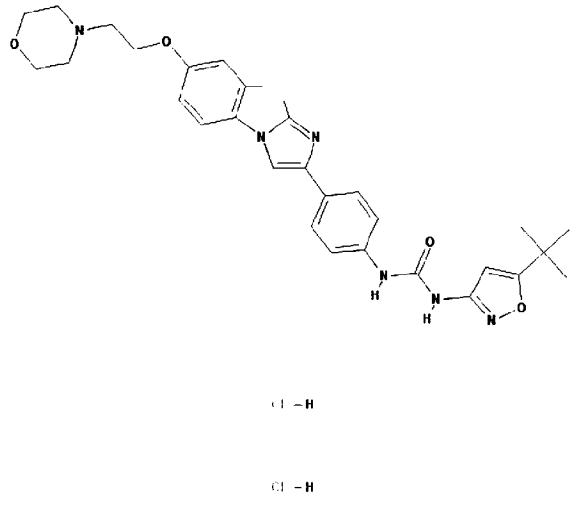
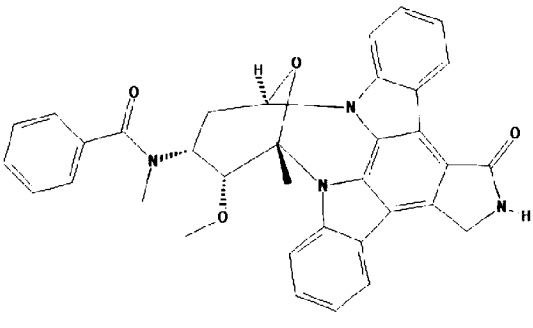
FLT3-2 CDLR1: KSSQSLLNSGNQKNYM и необязательно ее эквивалент.

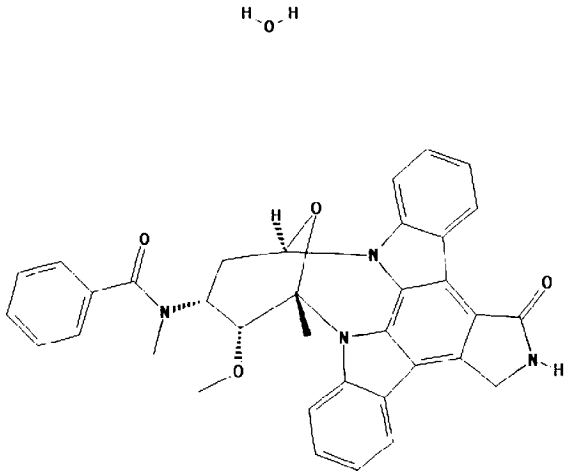
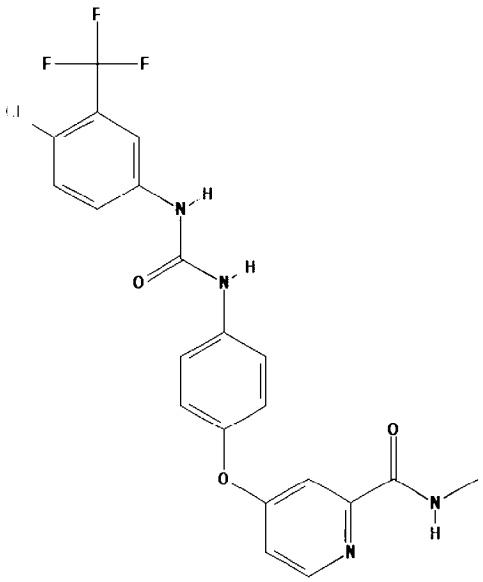
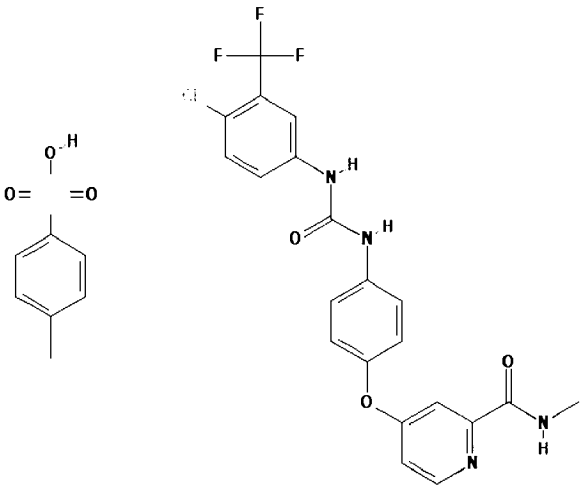
FLT3-2 CDLR2: GASTRES и необязательно ее эквивалент.

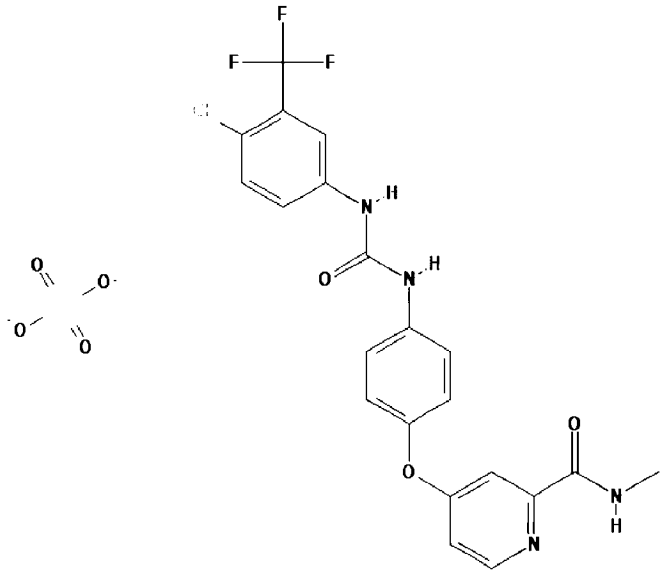
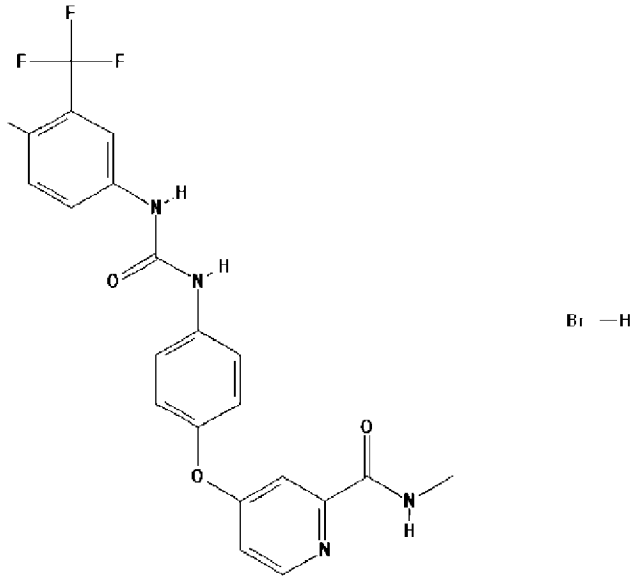
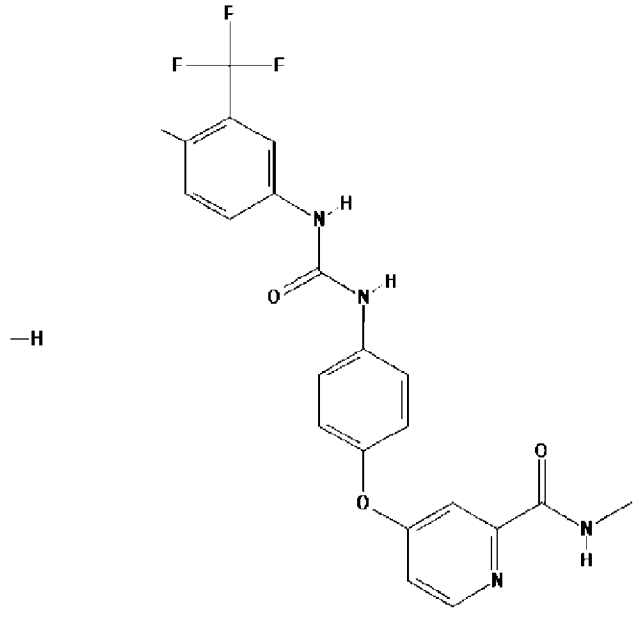
FLT3-2 CDLR3: QNDHSYPLT и необязательно ее эквивалент.

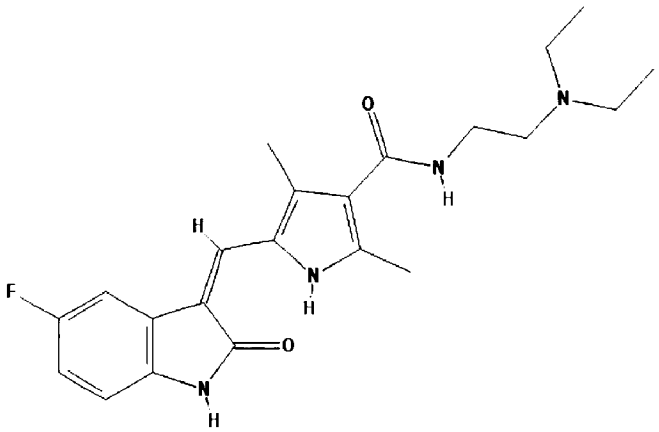
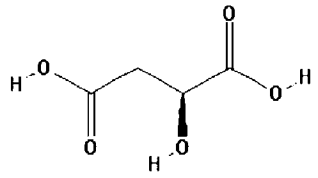
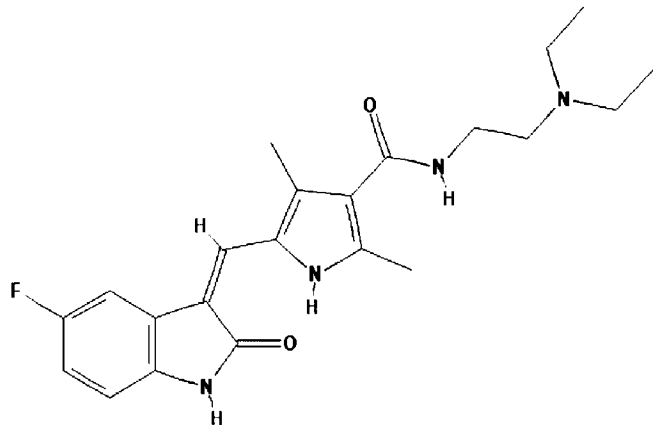
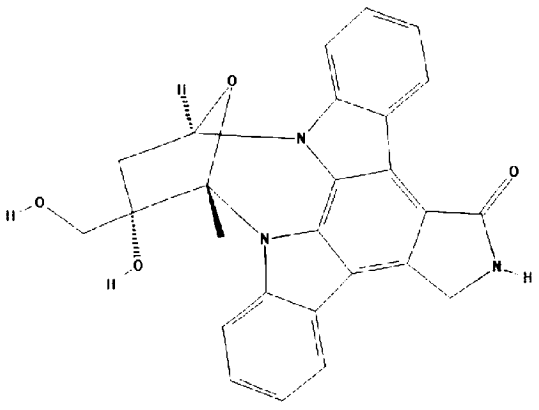
Используемый в настоящем документе термин «ингибитор FLT3» относится к молекуле, которая связывает FLT3 и снижает ее активность. Не будучи связанными теорией, полагают, что такие ингибиторы FLT3 могут повышать поверхностную экспрессию FLT3 на клетках. Неограничивающие примеры ингибиторов FLT3 включают гильтеритиниб (Astellas), хизаритиниб (Ambit Biosciences), мидостаурин (Novartis), сорафениб (Bayer and Onxy Pharmaceuticals), сунитиниб (Pfizer), лестарутиниб (Cephalon), FF-10101 (Fuijfilm), довитиниб (Novartis или Oncology Venture) или их эквиваленты, такие как, но не ограниченные ими, соли и гидраты. Типовые структуры некоторых из этих типовых ингибиторов FLT3 представлены в настоящем документе ниже:

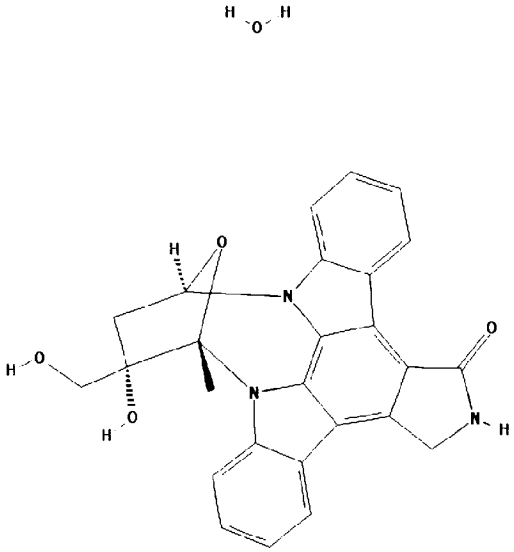
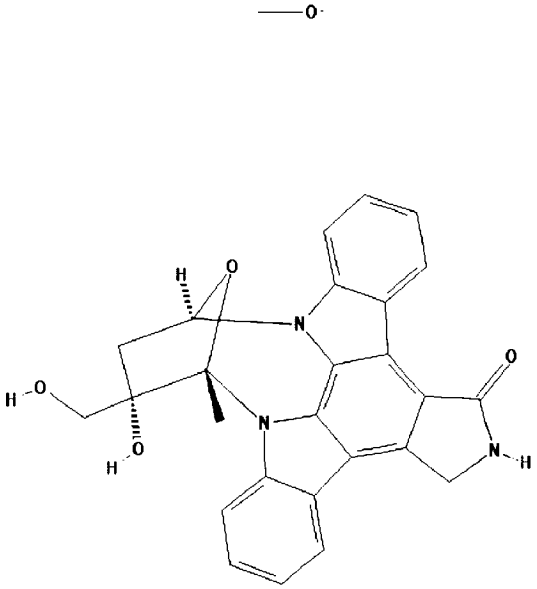
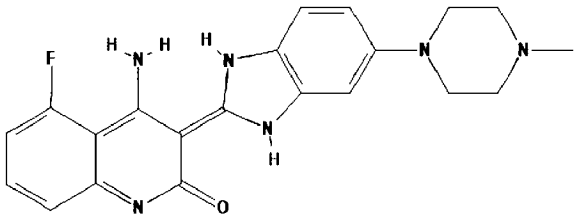
Наименование соединения	Химическая структура
Гилтеритиниб (CID 49803313)	

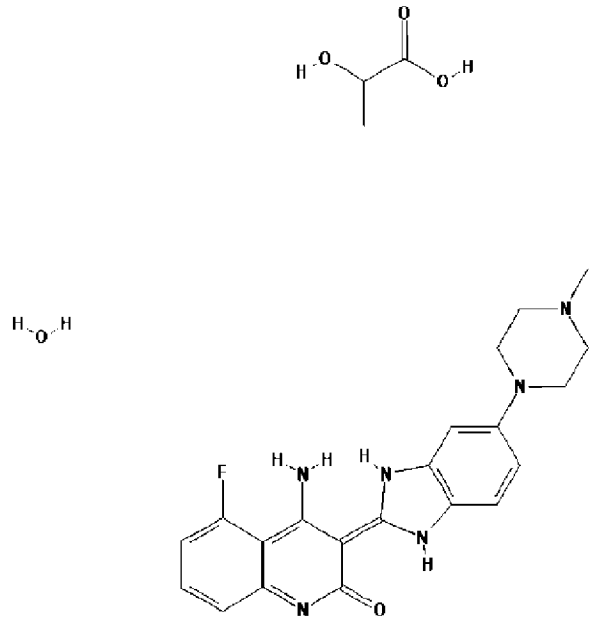
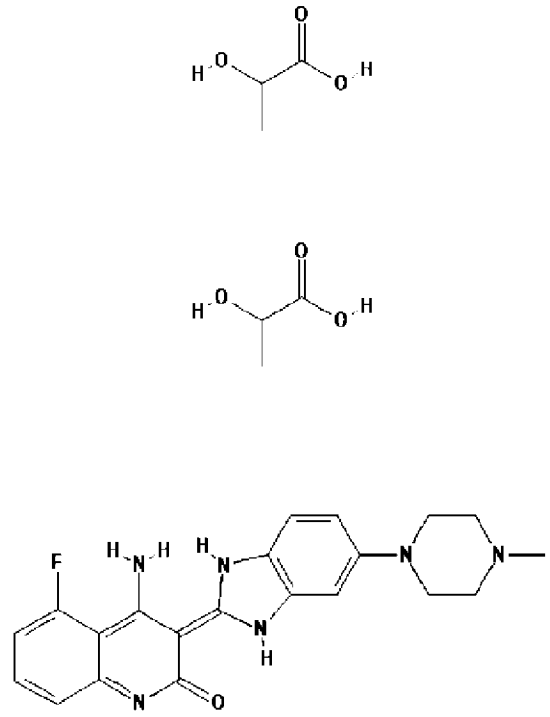
Гилтеритиниб фумарат (CID 76970819)	
Квизартиниб (CID 24889392)	
Квизартиниб дигидрохлорид (CID 25184035)	
Мидостаурин (CID 9829523)	

Мидостаурин гидрат (CID 71311854)	
Сорафениб (CID 216239)	
Сорафениб тозилат (CID 406563)	

Сорафениб сульфат (CID 86672519)	
Сорафениб гидробромид (CID 44599974)	
Сорафениб гидрохлорид (CID 44599975)	

Сунитиниб (CID 5329102)	
Сунитиниб малат (CID 6456015)	 
Лестарутиниб (CID 126565)	

Лестарутиниб гидрат (CID 45111934)	
Лестарутиниб метанолат (CID 131738508)	
Довитиниб (CID 9886808)	

Довитиниб лактат (CID 44150621)	
Довитиниб димолочная кислота (CID 66553150)	

Применяемый в настоящем описании термин «химерный антигенный рецептор» (CAR) относится к слитому белку, содержащему внеклеточный домен, способный связываться с антигеном, трансмембранный домен, полученный из полипептида, отличающегося от полипептида, из которого получен внеклеточный домен и, по меньшей мере, один внутриклеточный домен. «Химерный антигенный рецептор (CAR)» иногда называют «химерный рецептор», а «Т-тело» или «химерный иммунный рецептор (CIR)». «Внеклеточный домен, способный связываться с антигеном» означает любой олигопептид или полипептид, который может связываться с определенным антигеном. «Внутриклеточный домен» или «внутриклеточный сигнальный домен» означает любой олигопептид или полипептид, действующий как домен, который передает сигнал, чтобы вызвать активацию или ингибирование биологического процесса в клетке. В

определенных вариантах осуществления, внутриклеточный домен может содержать, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно содержит один или более костимулирующих сигнальных доменов в дополнение к первичному сигнальному домену. «Трансмембранный домен» означает любой олигопептид или полипептид, который может удлинять клеточную мембрану, и который может связывать внеклеточный и сигнальный домены. Химерный антигенный рецептор необязательно может содержать «шарнирный домен», который служит как линкер между внеклеточным и трансмембранным доменами. Неограничивающие типовые полинуклеотидные последовательности, которые кодируют компоненты каждого домена, раскрыты в настоящем документе, например:

Шарнирный домен: IgG1 шарнирная последовательность тяжелой цепи: CTCGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCG и необязательно ее эквивалент.

Шарнирный домен: шарнирная последовательность тяжелой цепи: LEPKSCDKTHTCPPCP и необязательно ее эквивалент.

Трансмембранный домен: CD28 трансмембранная область: TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACA GTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTG и необязательно ее эквивалент.

Трансмембранный домен: CD28 аминокислотная последовательность трансмембранной области: FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV и необязательно ее эквивалент.

Внутриклеточный домен: 4-1BB костимулирующая сигнальная область: AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGT ACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAG GAGGATGTGAACTG и необязательно ее эквивалент.

Внутриклеточный домен: 4-1BB аминокислотная последовательность костимулирующей сигнальной области: KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL и необязательно ее эквивалент.

Внутриклеточный домен: CD28 костимулирующая сигнальная область: AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCG CCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGC CTATCGCTCC и необязательно ее эквивалент.

Внутриклеточный домен: CD28 аминокислотная последовательность костимулирующей сигнальной области: RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS и необязательно ее эквивалент.

Внутриклеточный домен: CD3 дзета сигнальная область: AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACC AGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAG AGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGG

AAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATT GGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTC TCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTC GCTAA и необязательно ее эквивалент.

Внутриклеточный домен: CD3 аминокислотная последовательность дзета сигнальной области: RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR и необязательно ее эквивалент.

Другие варианты каждого типового домена включают другие белки, которые имеют аналогичную биологическую функцию, которые имеют, по меньшей мере, 70%, или альтернативно, по меньшей мере, 80% идентичность аминокислотной последовательности, предпочтительно, 90% идентичность последовательности, более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичность последовательности с белками, кодированными описанными выше последовательностями нуклеиновой кислоты. Дополнительно, неограничивающие примеры таких доменов представлены в настоящем документе.

Используемый в настоящем документе термин «линкерная последовательность» относится к любой аминокислотной последовательности, содержащей от 1 до 10, или альтернативно, 8 аминокислот или, альтернативно 6 аминокислот или, альтернативно, 5 аминокислот, которые могут повторяться от 1 до 10, или альтернативно, до примерно 8, или альтернативно, до примерно 6, или альтернативно, примерно 5, или 4 или альтернативно 3, или альтернативно 2 раза. Например, линкер может содержать вплоть до 15 аминокислотных остатков, состоящих из пентапептида, повторяющегося три раза. В одном аспекте, линкерной последовательностью является (Glycine4Serine)3 гибкий полипептидный линкер, содержащий три копии gly-gly-gly-gly-ser – представлены в виде однобуквенной последовательности GGGGS.

Используемый в настоящем документе термин «CD8 α шарнирный домен» относится к конкретному белковому фрагменту, ассоциированному с этим наименованием, и любым другим молекулам, которые имеют аналогичную биологическую функцию, которые имеют, по меньшей мере, 70%, или альтернативно, по меньшей мере, 80% идентичность аминокислотной последовательности, предпочтительно, 90% идентичность последовательности, более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичность последовательности с последовательностью CD8 α шарнирного домена, как показано в настоящем документе. Типовые последовательности CD8 α шарнирного домена для человека, мыши и других видов представлены в Pinto, R.D. et al. (2006) Vet. Immunol. Immunopathol. 110:169-177.

Последовательности, ассоциированные с CD8 α шарнирным доменом, представлены в Pinto, R.D. et al. (2006) Vet. Immunol. Immunopathol. 110:169-177. Неограничивающие примеры таковых включают:

CD8 альфа шарнирный домен человека: PAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY и необязательно ее эквивалент.

CD8 альфа шарнирный домен мыши: KVNSTTTKPVLRTPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDIY и необязательно ее эквивалент.

CD8 альфа шарнирный домен кошки: PVKPTTTPAPRPPTQAPITTSQRVSLRPGTCQPSAGSTVEASGLDLSCDIY и необязательно ее эквивалент.

Используемый в настоящем документе термин «CD8 α трансмембранный домен» относится к определенному белковому фрагменту, ассоциированному с этим наименованием, и любым другим молекулам, которые имеют аналогичную биологическую функцию, которые имеют, по меньшей мере, 70%, или альтернативно, по меньшей мере, 80% идентичность аминокислотной последовательности, предпочтительно, 90% идентичность последовательности, более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичность последовательности с последовательностью CD8 α трансмембранного домена, как показано в настоящем документе. Последовательности фрагмента, ассоциированные с аминокислотными положениями 183-203 CD8 альфа цепи Т-клеточного поверхностного гликопротеина человека (номер доступа GenBank: NP_001759.3) или аминокислотными положениями 197-217 CD8 альфа цепи Т-клеточного поверхностного гликопротеина мыши (номер доступа GenBank: NP_001074579.1) и аминокислотными положениями 190-210 CD8 альфа цепи Т-клеточного поверхностного гликопротеина крысы (Номер доступа GenBank: NP_ 113726.1) представляют дополнительные примеры последовательностей CD8 α трансмембранного домена. Последовательности, ассоциированные с каждым из перечисленных номеров доступа, представлены следующим образом:

CD8 альфа трансмембранный домен человека: IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT и необязательно ее эквивалент.

CD8 альфа трансмембранный домен мыши: IWAPLAGICVALLLSLIITLI и необязательно ее эквивалент.

CD8 альфа трансмембранный домен крысы: IWAPLAGICAVLLLSLVITLI и необязательно ее эквивалент.

Используемый в настоящем документе термин «4-1BB костимулирующая сигнальная область» относится к определенному белковому фрагменту, ассоциированному с этим наименованием, и любым другим молекулам, которые имеют аналогичную биологическую функцию, которые имеют, по меньшей мере, 70%, или альтернативно, по меньшей мере, 80% идентичность аминокислотной последовательности, предпочтительно, 90% идентичность последовательности, более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичность последовательности с последовательностью 4-1BB костимулирующей сигнальной области, как показано в

настоящем документе. Неограничивающие примеры последовательностей 4-1BB костимулирующей сигнальной области представлены в публикации США 20130266551A1, такие как типовая последовательность, представленная ниже 4-1BB костимулирующая сигнальная область: KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL и необязательно ее эквивалент.

Используемый в настоящем документе термин «ICOS костимулирующая сигнальная область» относится к определенному белковому фрагменту, ассоциированному с этим наименованием, и любым другим молекулам, которые имеют аналогичную биологическую функцию, которые имеют, по меньшей мере, 70%, или альтернативно, по меньшей мере, 80% идентичность аминокислотной последовательности, предпочтительно, 90% идентичность последовательности, более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичность последовательности с последовательностью ICOS костимулирующей сигнальной области, как показано в настоящем документе. Неограничивающий пример последовательности ICOS костимулирующей сигнальной области представлен в публикации заявки на патент США № 2015/0017141A1, где типовая полинуклеотидная последовательность представлена ниже.

ICOS костимулирующая сигнальная область:

ACAAAAAAGA AGTATTCATC CAGTGTGCAC GACCCTAACG GTGAATACAT GTTCATGAGA GCAGTGAACA CAGCCAAAAA ATCCAGACTC ACAGATGTGA CCCTA и необязательно ее эквивалент.

ICOS костимулирующая сигнальная область аминокислотной последовательности:

TKKKYSSSVHDPNGEYMFMRAVNTAKKSRLTDVTL и необязательно ее эквивалент.

Используемый в настоящем документе термин «OX40 костимулирующая сигнальная область» относится к определенному белковому фрагменту, ассоциированному с этим наименованием, и любым другим молекулам, которые имеют аналогичную биологическую функцию, которые имеют, по меньшей мере, 70%, или альтернативно, по меньшей мере, 80% идентичность аминокислотной последовательности, предпочтительно, 90% идентичность последовательности, более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичность последовательности с последовательностью OX40 костимулирующей сигнальной области, как показано в настоящем документе. Неограничивающий пример последовательности OX40 костимулирующей сигнальной области раскрыт в публикации заявки на патент США №2012/20148552A1 и включает типовую последовательность, представленную ниже.

OX40 костимулирующая сигнальная область:

AGGGACCAG AGGCTGCCCC CCGATGCCCA CAAGCCCCCT GGGGGAGGCA GTTTCCGGAC CCCCATCCAA GAGGAGCAGG CCGACGCCCA CTCCACCCTG GCCAAGATC и необязательно ее эквивалент.

OX40 костимулирующая сигнальная область аминокислотной последовательности:

RDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI и необязательно ее эквивалент.

Используемый в настоящем документе термин «CD28 трансмембранный домен» относится к определенному белковому фрагменту, ассоциированному с этим наименованием, и любым другим молекулам, которые имеют аналогичную биологическую функцию, которые имеют, по меньшей мере, 70%, или альтернативно, по меньшей мере, 80% идентичность аминокислотной последовательности, предпочтительно, 90% идентичность последовательности, более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичность последовательности с последовательностью CD28 трансмембранного домена, как показано в настоящем документе. Последовательности фрагмента, ассоциированные с Номером доступа GenBanks: XM_006712862.2 и XM_009444056.1 являются дополнительным не ограничивающим примером последовательностей CD28 трансмембранного домена.

Используемый в настоящем документе термин «CD28 костимулирующая сигнальная область» относится к определенному белковому фрагменту, ассоциированному с этим наименованием, и любым другим молекулам, которые имеют аналогичную биологическую функцию, которые имеют, по меньшей мере, 70%, или альтернативно, по меньшей мере, 80% идентичность аминокислотной последовательности, предпочтительно, 90% идентичность последовательности, более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичность последовательности с последовательностью CD28 костимулирующей сигнальной области, показанной в настоящем документе. Примерные последовательности CD28 костимулирующего сигнального домена представлены в патенте США № 5,686,281; Geiger, T.L. et al. (2001) Blood 98: 2364-2371; Hombach, A. et al. (2001) J Immunol 167: 6123-6131; Maher, J. et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20: 70-75; Haynes, N.M. et al. (2002) J Immunol 169: 5780-5786 (2002); Haynes, N.M. et al. (2002) Blood 100: 3155-3163. Неограничивающие примеры включают остатки 114-220 ниже. CD28 последовательность: MLRLLLALNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV AYDNAVNLSC KYSYNLFSRE FRASLHKGLDSAVEVCVVYG NYSQQLQVYS KTGFNCDGKL GNESVTFYLQ NLYVNQTDIY FCKIEVMYPPPYLDNEKSNG TIIHVKGKHL CPSPLFPGPS KPFWVLVVVG GVLACYSLLVTVAFIIFWVR SKRSRLLHSD YMNMTPRRPG PTRKHYQPYA PPRDFAAYRS и ее эквиваленты.

Используемый в настоящем документе термин «CD3 дзета сигнальный домен» относится к определенному белковому фрагменту, ассоциированному с этим наименованием, и любым другим молекулам, которые имеют аналогичную биологическую функцию, которые имеют, по меньшей мере, 70%, или альтернативно, по меньшей мере, 80% идентичность аминокислотной последовательности, предпочтительно, 90% идентичность последовательности, более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичность последовательности с последовательностью CD3 дзета сигнального домена, как показано в настоящем документе. Неограничивающий пример последовательности

CD3 дзета сигнального домена представлен в патенте США № 8,399,645, например: RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR.

Используемый в настоящем документе термин «ген самоубийства» является геном, способным вызывать апоптоз клетки; неограничивающие примеры включают HSV-TK (тимидинкиназу вируса простого герпеса), цитозиндеаминазу, нитроредуктазу, карбоксилэстеразу, цитохром P450 или PNP (пурин-нуклеозидфосфорилазу), усеченный EGFR или индуцируемую каспазу («iCasp»). Гены самоубийства могут действовать через множество путей, и, в некоторых случаях, могут индуцироваться индуцирующим агентом, таким как малая молекула. Например, iCasp ген самоубийства содержит часть белка каспазы, функционально связанную с белком, оптимизированным для связывания с индуцирующим агентом; введение индуцирующего агента в клетку, содержащую ген самоубийства, вызывает активацию каспазы и последующий апоптоз указанной клетки.

Термин «FKBP» или FK506 связывающий белок относится к семейству белков, которые имеют активность пропилизомеразы и являются родственными циклофилинам по функции. FKBP был идентифицирован во множестве эукариотов от дрожжей до человека, и функционирует как шапероны сворачивания белка, содержащие пролиновые остатки. Вместе с циклофилином, FKBP принадлежит к семейству иммунофилинов. Неограничивающим типовым FKBP является FKBP12 человека (также называемый FKBP1A), ссылочный номер UniProt P62942. Другие неограничивающие примеры FKBP включают такие, которые представлены номерами доступа GenBanks AH002818, BC119732.1, NM_001199786.1 и NM_054014.3.

Используемый в настоящем документе термины «T2A» и «2A пептид» используются взаимозаменяемо для обозначения любого 2A пептида или его фрагмента, любого 2A-подобного пептида или его фрагмента, или искусственного пептида, содержащего необходимые аминокислоты в относительно короткой пептидной последовательности (порядка 20 аминокислот в зависимости от вируса происхождения), содержащей консенсусный полипептидный мотив D-V/I-E-X-N-P-G-P, где X относится к любой аминокислоте, которая обычно считается саморасщепляющейся.

Термин «трансдуцировать» или «трансдукция» в применении к образованию клеток химерного антигенного рецептора относится к процессу, посредством которого чужеродную нуклеотидную последовательность вводят в клетку. В некоторых вариантах осуществления, эта трансдукция осуществляется через вектор.

«Композиция» обычно подразумевает комбинацию активного агента, например, соединения или композиции, и встречающегося в природе или не встречающегося в природе носителя, инертного (например, определяемого агента или метки) или активного, такого как адъювант, разбавитель, связующий агент, стабилизатор, буферы, соли, липофильные растворители, консервант, адъювант и подобные, и включают фармацевтически приемлемые носители. Носители также включают фармацевтические эксципиенты и добавки, белки, пептиды, аминокислоты, жиры и углеводы (например,

сахара, включая моносахариды, ди-, три-, тетраолигосахариды и олигосахариды; дериватизированные сахара, такие как альдиты, альдоновые кислоты, эстерифицированные сахара и подобные; и полисахариды или полимеры сахаров), которые могут присутствовать по отдельности или в комбинации, составляющие отдельно или в комбинации 1-99,99% по массе или объему. Примеры белковых эксципиентов включают сывороточный альбумин, такой как человеческий сывороточный альбумин (HSA), рекомбинантный человеческий альбумин (rHA), желатин, казеин и подобные. Типовые компоненты аминокислот/антител, которые также могут действовать в качестве буферной емкости, включают аланин, аргинин, глицин, аргинин, бетаин, гистидин, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, цистеин, лизин, лейцин, изолейцин, валин, метионин, фенилаланин, аспартам и подобные. Углеводные эксципиенты также входят в объем данной технологии, примеры которых включают, но не ограничиваются ими, моносахариды, такие как фруктоза, мальтоза, галактоза, глюкоза, D-манноза, сорбоза и подобные; дисахариды, такие как лактоза, сахароза, трегалоза, целлобиоза и подобные; полисахариды, такие как рафиноза, мелезитоза, мальтодекстрины, декстраны, крахмалы и подобные; и альдиты, такие как маннит, ксилит, мальтит, лактит, ксилит, сорбит (глюцит) и миоинозит.

В данном контексте «рак» является болезненным состоянием, характеризующимся наличием у субъекта клеток, демонстрирующих аномальную неконтролируемую репликацию, и может использоваться взаимозаменяемо с термином «опухоль». В некоторых вариантах осуществления, раком является лейкоз или лимфома. В некоторых вариантах осуществления, раком является собой острый миелоидный лейкоз или острый лимфобластный лейкоз. Используемый в настоящем документе термин «лейкоз» означает рак крови или костного мозга, характеризующийся аномальным увеличением незрелых белых клеток крови. Специфическое состояние острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), также называемого острым миелогенным лейкозом или острым миелобластным лейкозом, представляет собой рак клеток крови миелоидного происхождения, характеризующийся быстрым ростом аномальных миелоидных клеток, которые накапливаются в костном мозге и вмешиваются в продуцирование нормальных клеток крови. Специфическое состояние острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), также называемого острым лимфоцитарным лейкозом или острым лимфоидным лейкозом, представляет собой рак белых кровяных клеток, характеризующийся перепроизводством и накоплением злокачественных незрелых лейкоцитов (лимфобластов), что приводит к отсутствию нормальных, здоровых клеток крови. Используемый в настоящем документе термин «лимфома» означает рак крови, характеризующийся развитием опухолей клеток крови и симптомами увеличения лимфатических узлов, лихорадки, обильного потоотделения, непреднамеренной потери веса, зуда и постоянного чувства усталости.

«Солидной опухолью» является аномальная масса ткани, которая обычно не содержит кисты или жидкие участки. Солидные опухоли могут быть доброкачественными или злокачественными, метастатическими или не метастатическими. Различные типы

солидных опухолей названы по типу клеток, которые их образуют. Примеры солидных опухолей включают саркомы, карциномы и лимфомы.

«Нормальная клетка, соответствующая типу раковой ткани» относится к нормальной клетке из того же типа ткани, что и раковая ткань. Неограничивающим примером является нормальный лейкоцит пациента, например, пациента с лейкозом.

В контексте настоящего описания «лечить» или «лечение» заболевания у субъекта относится к (1) предотвращению появления симптомов или заболевания у субъекта, который предрасположен или еще не проявляет симптомы заболевания; (2) ингибированию заболевания или остановке его развития; или (3) облегчению или регрессу заболевания или симптомов заболевания. Как понимается в данной области техники, «лечением» является подход для получения полезных или желаемых результатов, включая клинические результаты. Для целей настоящей технологии полезные или желаемые результаты могут включать в себя один или более из, но не ограничиваются ими, облегчения или улучшения одного или нескольких симптомов, уменьшения степени состояния (включая заболевание), стабилизации (т. е. не ухудшения) статуса состояния (включая заболевание), отсрочки или замедления состояния (включая заболевание), прогрессирования, улучшения или временного облегчения состояния (включая заболевание), статусов и ремиссии (частичной или полной), обнаруживаемых или не обнаруживаемых. Лечение, включающее раскрытые композиции и способы, может быть терапией первой линии, второй линии, третьей линии, четвертой линии, пятой линии и предназначено для использования в качестве единственной терапии или в комбинации с другими подходящими видами лечения. В одном аспекте, «лечение» исключает профилактику. Когда заболеванием является рак, следующие клинические конечные точки являются неограничивающими примерами лечения: уменьшение опухолевой нагрузки, замедление роста опухоли, более длительная общая выживаемость, более длительное время до прогрессирования опухоли, ингибирование метастазирования или уменьшение метастазирования опухоли.

Фраза «первая линия» или «вторая линия» или «третья линия» относится к порядку лечения, полученному пациентом. Терапией первой линии является лечение, которое дается первым, тогда как терапия второй или третьей линии дается после терапии первой линии или после терапии второй линии, соответственно. National Cancer Institute определяет терапию первой линии как «первое лечение болезни или состояния. У пациентов с раком первичным лечением может быть хирургическое вмешательство, химиотерапия, радиационная терапия или комбинация этих терапий. Специалисты в данной области также называют терапию первой линии «первичной терапией и первичным лечением». См. веб-сайт National Cancer Institute по адресу www.cancer.gov, последнее посещение 1 мая 2008 г. Обычно пациенту дают последующий режим химиотерапии, поскольку у пациента не наблюдается положительного клинического или субклинического ответа на терапию первой линии, или терапию первой линии останавливают.

«Эффективное количество» или «эффективное количество» относится к количеству агента или объединенным количествам двух или нескольких агентов, которое при введении для лечения млекопитающего или другого субъекта является достаточным для осуществления такого лечения заболевания. «Эффективное количество» будет варьироваться в зависимости от агента(ов), заболевания и его тяжести, возраста, массы тела и т.д. субъекта, подлежащего лечению.

В настоящем описании «циторедуктивная терапия» включает, но не ограничен ими, химиотерапию, криотерапию и радиационную терапию. Агенты, снижающие клеточную пролиферацию, известны в данной области и широко используются. Химиотерапевтические лекарственные средства, которые убивают раковые клетки только при их делении, называются специфичными к клеточному циклу. Эти препараты включают агенты, которые действуют в S-фазе, включая ингибиторы топоизомеразы и анти-метаболиты.

Ингибиторами топоизомеразы являются препараты, которые препятствуют действию ферментов топоизомеразы (топоизомеразы I и II). В процессе химиотерапии, ферменты топоизомеразы контролируют манипуляции со структурой ДНК, необходимые для репликации, и, поэтому являются специфическими к клеточному циклу. Примеры ингибиторов топоизомеразы I включают перечисленные выше аналоги камптотекана, иринотекана и топотекана. Примеры ингибиторов топоизомеразы II включают амсакрин, этопозид, этопозид фосфат и тенипозид.

Антиметаболиты обычно являются аналогами нормальных метаболических субстратов, часто вмешивающимися в процессы, вовлеченные в репликацию хромосом. Они атакуют клетки на очень определенных этапах цикла. Антиметаболиты включают антагонисты фолиевой кислоты, например, метотрексат; антагонист пиримидина, например, 5-фторурацил, фоксуридин, цитарабин, капецитабин и гемцитабин; антагонист пурина, например, 6-меркаптопурин и 6-тиогуанин; ингибитор аденозиндезаминазы, например кладрибин, флударабин, неларабин и пентостатин; и подобные.

Растительные алкалоиды получают из определенных видов растений. Алкалоиды барвинка производятся из растения барвинок (Catharanthus rosea). Таксаны делают из коры тиса тихоокеанского (taxus). Алкалоиды барвинка и таксаны также известны как антимикротубулиновые агенты. Подофиллотоксины получают из яблони майской. Аналоги камптотекана получают из азиатского «счастливого дерева» (Camptotheca acuminata). Аналоги подофиллотоксинов и камптотекана также классифицируют как ингибиторы топоизомеразы. Растительные алкалоиды обычно являются специфичными к клеточному циклу.

Примеры этих агентов включают алкалоиды барвинка, например винкристин, винбластин и винорелбин; таксаны, например, паклитаксел и доцетаксел; подофиллотоксины, например, этопозид и тенизопид; и аналоги камптотекана, например, иринотекан и топотекан.

Криотерапия включает, но не ограничена ими, терапии, включающие снижение

температуры, например, гипотермическую терапию.

Радиационная терапия включает, но не ограничивается ими, облучение, например ионизирующим излучением, УФ-излучением, как известно в данной области. Примеры дозировок включают, но не ограничиваются ими, дозу ионизирующего излучения в диапазоне от по меньшей мере, примерно 2 Гр до не более чем примерно 10 Гр и/или дозу ультрафиолетового излучения в диапазоне от, по меньшей мере, примерно От 5 Дж/м^2 до не более примерно 50 Дж/м^2, обычно примерно 10 Дж/м^2.

Используемый в настоящем документе термин «гемопоэз» относится к способности субъекта продуцировать клетки крови и/или тромбоциты в костном мозге. Термин «нормальный гемопоэз» может относиться либо к исходному уровню гемопоэза субъекта и/или к клинически приемлемому порогу нормального гемопоэза, основанному на средних уровнях клеток крови и/или тромбоцитов, продуцируемых популяцией субъектов, не страдающих заболеванием или расстройством, влияющим на гемопоэз, таким как, но не ограничиваясь ими, рак крови или костного мозга. Таким образом, используемый в настоящем документе термин «поддерживать нормальный гемопоэз» относится к способности субъекта поддерживать указанный нормальный уровень во время или после вмешательства, а термин «восстанавливать нормальный гемопоэз» означает способность субъекта возвращаться к указанному нормальному уровню во время или после вмешательства.

Используемый в настоящем документе термин «CD34» относится к белку, экспрессированному на множестве клеток, включая, но не ограничиваясь ими, гемопоэтические клетки и субпопуляцию дендритных клеток, ассоциированных с Gene Cards ID GC01M207880. Неограничивающая типовая белковая последовательность CD34 человека может быть найдена под UniProt Ref. No. P28906; CD34 мыши, UniProt Ref. No. Q64314. «CD34+» клетками являются клетки, в которых определена поверхностная экспрессия CD34. Неограничивающие типовые CD34+ клетки включают гемопоэтические стволовые клетки, которые способны к самообновлению, пролиферации и дифференциации в предшественники в миелоидных, лимфоидных и эритроидных линиях, найденных в Lin-CD34+CD38-CD90+CD45RA- компартменте; эти клетки являются критическими к приживлению гемопоэтических клеток, и также известны как FLT3+. См. Bhatia et al. (1997) PNAS 94(10):5230-5235; Notta et al. (2010) Blood 115(18):3074-3077; Kikushige et al. (2008) J. Immunol. 180(11):7358-7367.

Используемый в настоящем документе термин «очищенный» не требует абсолютной чистоты; скорее, это понятие относительное. Таким образом, например, очищенными нуклеиновой кислотой, пептидом, белком, биологическими комплексами или другими активными соединениями является такое, которое полностью или частично выделено из белков или других примесей. Как правило, по существу очищенные пептиды, белки, биологические комплексы или другие активные соединения для использования в настоящем описании содержат более 80% всех макромолекулярных видов, присутствующих в препарате перед смешиванием или составлением пептида, белка,

биологического комплекса или другого активного соединения с фармацевтическим носителем, эксципиентом, буфером, агентом, увеличивающим абсорбцию, стабилизатором, консервантом, адъювантом или другим дополнительным ингредиентом в полном фармацевтическом составе для терапевтического введения. Более типично, пептид, белок, биологический комплекс или другое активное соединение очищают так, чтобы составлять более 90%, часто более 95% всех макромолекулярных видов, присутствующих в очищенном препарате до смешивания с другими ингредиентами препарата. В других случаях, очищенный препарат может быть по существу гомогенным, при этом другие макромолекулярные частицы не обнаруживаются обычными методами.

Используемый в настоящем документе термин «обнаруживаемый маркер» относится к, по меньшей мере, одному маркеру, способному прямо или косвенно производить обнаруживаемый сигнал. Неполный список этого маркера включает ферменты, которые производят обнаруживаемый сигнал, например, с помощью колориметрии, флуоресценции, люминесценции, такие как пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, β-галактозидаза, глюкоза-6-фосфатдегидрогеназа, хромофоры, такие как флуоресцентные, люминесцентные красители, группы с электронной плотностью, определяемые с помощью электронной микроскопии или по их электрическим свойствам, таким как проводимость, амперометрия, вольтамперометрия, импеданс, обнаруживаемые группы, например, молекулы которых имеют достаточный размер, чтобы вызвать обнаруживаемые модификации в их физических и/или или химических свойств, такое обнаружение может быть выполнено оптическими методами, такими как дифракция, поверхностный плазмонный резонанс, вариация поверхности, изменение угла контакта, или физическими методами, такими как спектроскопия атомных сил, туннельный эффект или радиоактивные молекулы, такие как ^{32}P, ^{35}S или ^{125}I. В одном аспекте, определяемый маркер исключает естественно флуоресцентные полинуклеотиды.

Используемый в настоящем документе термин «маркер очистки» относится к, по меньшей мере, одному маркеру, применяемому для очистки или идентификации. Неполный список этого маркера включает His, lacZ, GST, белок, связывающий мальтозу, NusA, BCCP, c-myc, CaM, FLAG, GFP, YFP, вишню, тиоредоксин, поли(NANP), V5, Snap, HA, белок, связывающий хитин, Softag 1, Softag 3, Strep, или S-белок. Подходящий прямой или косвенный маркер флуоресценции содержит FLAG, GFP, YFP, RFP, dTomato, вишню, Cy3, Cy 5, Cy 5.5, Cy 7, DNP, AMCA, биотин, дигоксигенин, Tamra, Texas Red, родамин, Alexa fluor, FITC, TRITC или любой другой флуоресцентный краситель или гаптен.

Используемый в настоящем документе термин «вектор» относится к конструкту нуклеиновой кислоты, предназначенному для переноса между разными хозяевами, включающему, но не ограниченному ими, плазмиду, вирус, космиду, фаг, BAC, YAC и т.д. В некоторых вариантах осуществления, плазмидные векторы могут быть получены из коммерчески доступных векторов. В других вариантах осуществления, вирусные векторы могут быть получены из бакуловирусов, ретровирусов, аденовирусов, AAV и т.д. согласно

методикам, известным в данной области. В одном варианте осуществления, вирусным вектором является лентивирусный вектор. Используемый в настоящем документе термин «полицистронный» в отношении вектора относится к вектору, содержащему несколько кодирующих областей (экзонов), например, моноцистронному (имеющему одну кодирующую область), бицистронному (имеющему две кодирующие области) и трицистронному (имеющему три кодирующие области).

Последовательности, ассоциированные с каждой из вышеперечисленных номеров доступа GenBanks, ссылочных номеров UniProt, других ссылочных ID номеров и ссылок, включены сюда в качестве ссылки.

Список сокращений

ОМЛ: острый миелоидный лейкоз

ОЛЛ: острый лимфобластный лейкоз

CAR: химерный антигенный рецептор

iCasp: индуцированная каспаза

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Благодаря недавно полученным беспрецедентным результатам при В-клеточных лимфомах и лейкозах с использованием аутологичного лечения с помощью Т-клеток генетически сконструированного химерного антигенного рецептора (CAR) (Maude, S.L. et al. (2014) New Engl. J. Med. 371:1507-1517; Porter, D.L. et al. (2011) New Engl. J. Med. 365:725-733), ряд лабораторий начали применять этот подход к солидным опухолям, включая рак яичников, рак простаты и опухоли поджелудочной железы. CAR модифицированные Т-клетки объединяют HLA-независимую таргетную специфичность моноклонального антитела с цитолитической активностью, пролиферацией и свойствами хоуминга активированных Т-клеток, но не отвечают на супрессию контрольной точки. Благодаря своей способности напрямую убивать мишени, экспрессирующие антиген, CAR Т-клетки являются высокотоксичными для любых антиген-положительных клеток или тканей, что требует конструирования CAR с высоко опухолеспецифическими антителами. К настоящему времени CAR модифицированные Т-клетки солидных опухолей человека были сконструированы против рецептора α-фолиевой кислоты, мезотелина, MUC-CD, PSMA и других мишеней; но большинство из них имеют некоторую нецелевую экспрессию антигена в нормальных тканях. Эти конструкты не показали таких же исключительных результатов у пациентов, что подчеркивает необходимость дополнительных исследований для определения новых мишеней и методов конструирования CAR Т-клеток, которые можно использовать против солидных опухолей и других видов рака. Настоящее раскрытие решает эти проблемы. Заявитель обнаружил, что CAR NK-клетки или NK-клетка в пролонгированной культуре экспрессируют значительные количества белка контрольной точки PD-1, который является ингибирующим сигналом для NK-клеток онкологического пациента, тогда как бласты ОМЛ экспрессируют PD-L1 на поверхности клетки. По сравнению с предыдущими биспецифическими платформами и другими группами, основной проблемой

биспецифических антител («biAb») является это короткий период полувыведения, ограничивающий биодоступность и эффективность. Следовательно, заявитель стремится преодолеть это техническое ограничение и обеспечить синергетическую цитолитическую активность против ОМЛ за счет повышенного взаимодействия, повышенной активации и антагонистического ингибирования контрольных точек.

Таким образом, это описание представляет один или более выделенных полинуклеотидов и/или векторов, кодирующих химерный антигенный рецептор (CAR), включающий: 1) связывающий домен, специфичный для FLT3, который в некоторых аспектах является антигенсвязывающим доменом aFLT3 антитела, и 2) антигенсвязывающий домен, который распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1. Далее здесь представлены способы и композиции, относящиеся к их применению и производству.

Химерные антигенные рецепторы и их применения

Компоненты CAR

В настоящем раскрытии представлены химерные антигенные рецепторы (CAR), которые связываются с FLT3, причем CAR включает или состоит по существу из, или состоит из группы активации клетки, включающей внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный домен. Внеклеточный домен содержит мишень-специфичный связывающий элемент, иначе называемый антигенсвязывающим доменом. В одном аспекте, внутриклеточный домен или цитоплазматический домен содержит костимулирующую сигнальную область и часть дзета цепи. CAR может необязательно дополнительно содержать спейсерный домен вплоть до 300 аминокислот, предпочтительно, 10-100 аминокислот, более предпочтительно, 25-50 аминокислот.

Спейсерный домен. CAR может необязательно дополнительно содержать спейсерный домен вплоть до 300 аминокислот, предпочтительно, 10-100 аминокислот, более предпочтительно, 25-50 аминокислот. Например, спейсер может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 аминокислот. Спейсерный домен может включать, например, часть домена Fc человека, CH3 домен или шарнирную область любого иммуноглобулина, такого как IgA, IgD, IgE, IgG или IgM, или их варианты. Например, некоторые варианты осуществления могут содержать шарнир IgG4 с S228P, L235E и/или N297Q мутацией или без нее (согласно нумерации по Кэботу). Дополнительные спейсеры включают, но не ограничены ими, шарнирные области CD4, CD8 и CD28.

Антигенсвязывающий домен. CAR по настоящему описанию содержит антигенсвязывающий домен FLT3 антитела или антитела (т.е. полного антитела), которое связывает FLT3. Моноклональные антитела, которые специфически связывают FLT3, коммерчески доступны от, например, Becton Dickinson Biosciences и других коммерческих источников, например, перечисленных на сетевом адресе: biocompare.com/Search-Antibodies/?search=FLT3&said=0. Способы получения антигенсвязывающих фрагментов

известны в данной области техники и кратко описаны в настоящем документе. Антигенсвязывающие домены могут быть от любых подходящих видов, например, овцы ли человека.

В одном аспекте, антигенсвязывающий домен включает переменную области тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи FLT3 антитела. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен содержит, или состоит по существу из фрагмента мишень-специфичного антитела (т.е. анти-FLT3-антитела), например, scFv. Область scFv может включать вариабельные области тяжелых (V_H) и легких цепей (V_L) иммуноглобулинов, связанных с коротким линкерным пептидом. Линкерный пептид может содержать от 1 до 50 аминокислот, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, линкер обогащен глицином, хотя он также может содержать серин или треонин.

В некоторых вариантах осуществления, вариабельная область тяжелой цепи содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из, полипептида, кодированного полинуклеотидной последовательностью: CAGGTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTTGTGAAGCCTGGGGCTTCATTGAA GCTGTCCTGCAAGTCTTCCGGGTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAG GCAGAGGCCTGGACATGGCCTTGAGTGGATCGGAGAGATTGATCCTTCTGACAGTT ATAAAGACTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTGGACAGATCC TCCAACACAGCCTACATGCACCTCAGCAGCCTGACATCTGATGACTCTGCGGTCTAT TATTGTGCAAGAGCGATTACGACGACCCCCTTTGACTTCTGGGGCCAAGGCACCACT CTCACAGTCTCCTCA или ее антигенсвязывающим фрагментом или ее эквивалентом.

В других вариантах осуществления, вариабельная область тяжелой цепи содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из, полипептидной последовательности: QVQLQQPGAELVKPGASLKLSCKSSGYTFTSYWMHWVRQRPGHGLEWIGEIDPSDSYK DYNQKFKDKATLTVDRSSNTAYMHLSSLTSDDSAVYYCARAITTTPFDFWGQGTTLTV SS, или ее антигенсвязывающего фрагмента или ее эквивалента.

В некоторых вариантах осуществления, вариабельная область тяжелой цепи содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из полипептида, кодированного раскрытой полинуклеотидной последовательностью: CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCCTGTC CATCACCTGCACAGTCTCTGGTTTCTCATTAACTAACTATGGTTTACACTGGGTTCGC CAGTCTCCAGGAAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGAGTGATATGGAGTGGTGGAAGCAC AGACTATAATGCAGCTTTCATATCCAGACTGAGCATCAGCAAGGACAACTCCAAGA GCCAAGTTTTCTTTAAAATGAACAGTCTGCAGGCTGATGACACAGCCATATACTACT GTGCCAGAAAAGGAGGGATCTACTATGCTAACCATTACTATGCTATGGACTACTGG GGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA или ее антигенсвязывающим фрагментом

или ее эквивалентом.

В других вариантах осуществления, вариабельная область тяжелой цепи содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из полипептидной последовательности: QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGLHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGSTDY NAAFISRLSISKDNSKSQVFFKMNSLQADDTAIYYCARKGGIYYANHYYAMDYWGQGT SVTVSS, или ее антигенсвязывающего фрагмента или ее эквивалента.

В некоторых вариантах осуществления, вариабельная область тяжелой цепи содержит CDRH1 последовательность, содержащую или, альтернативно, состоящую по существу из, или, также дополнительно состоящую из аминокислотной последовательности, начиная с SYWMH, NYGLH, или эквивалента каждой из них, за которыми следуют дополнительные 50 аминокислот или, альтернативно, примерно 40 аминокислот или, альтернативно, примерно 30 аминокислот или, альтернативно, примерно 20 аминокислот или, альтернативно, примерно 10 аминокислот или, альтернативно, примерно 5 аминокислот или, альтернативно, примерно 4 или 3 или 2 или 1 аминокислота на карбокси-конце.

В некоторых вариантах осуществления, вариабельная область тяжелой цепи содержит CDRH2 последовательность, содержащую или, альтернативно, состоящую по существу из или, также дополнительно состоящую из, аминокислотной последовательности, начинающеся с EIDPSDSYKDYNQKFKD, VIWSGGSTDYNAAFIS, или эквивалента каждой из них, за которыми следуют дополнительные 50 аминокислот или, альтернативно, примерно 40 аминокислот или, альтернативно, примерно 30 аминокислот или, альтернативно, примерно 20 аминокислот или, альтернативно, примерно 10 аминокислот или, альтернативно, примерно 5 аминокислот или, альтернативно, примерно 4 или 3 или 2 или 1 аминокислота на карбокси-конце.

В некоторых вариантах осуществления, вариабельная область тяжелой цепи содержит CDRH3 последовательность, содержащую или, альтернативно, состоящую по существу из или, также дополнительно состоящую из, аминокислотной последовательности, начинающеся с AITTTPFDF, GGIYYANHYYAMDY, или эквивалента каждой из них, за которыми следуют дополнительные 50 аминокислот или, альтернативно, примерно 40 аминокислот или, альтернативно, примерно 30 аминокислот или, альтернативно, примерно 20 аминокислот или, альтернативно, примерно 10 аминокислот или, альтернативно, примерно 5 аминокислот или, альтернативно, примерно 4 или 3 или 2 или 1 аминокислота на карбокси-конце.

В некоторых вариантах осуществления, вариабельная область легкой цепи содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из, полипептида, кодированного полинуклеотидной последовательностью: GATATTGTGCTAACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGATAGCGTC AGTCTTTCCTGCAGGGCCAGCCAGAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTATCAACAA AAATCACATGAGTCTCCAAGGCTTCTCATCAAGTATGCTTCCCAGTCCATCTCTGGG

ATCCCCTCCAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCTCAGTATCAAC
AGTGTGGAGACTGAAGATTTTGGAGTGTATTTCTGTCAACAGAGTAACACCTGGCCG
TACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG, или ее антигенсвязывающим фрагментом или ее эквивалентом.

В других вариантах осуществления, вариабельная область легкой цепи содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из, полипептидной последовательности: DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQSISNNLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSISGIPSRF SGSGSGTDFTLSINSVETEDFGVYFCQQSNTWPYTFGGGTKLEIKR, или ее антигенсвязывающего фрагмента или ее эквивалента.

В некоторых вариантах осуществления, вариабельная область легкой цепи содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из, полипептида, кодированного полинуклеотидной последовательностью: GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGAGTGTGTCAGCAGGAGAGAAGGTC ACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAAACAGTGGAAATCAAAAGAACTA TATGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCTAAACTGTTGATCTACGGGG CATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACCG ATTTCACTCTTACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTC AGAATGATCATAGTTATCCGCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA CGG, или ее антигенсвязывающим фрагментом или эквивалентом каждой из них.

В других вариантах осуществления, вариабельная область легкой цепи содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из, полипептидной последовательности: DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYMAWYQQKPGQPPKLLIYGAS TRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDHSYPLTFGAGTKLELKR или ее антигенсвязывающего фрагмента или ее эквивалента.

В некоторых вариантах осуществления, вариабельная область легкой цепи содержит CDRL1 последовательность, содержащую или, альтернативно, состоящую по существу из или, также дополнительно состоящую из, аминокислотной последовательности, начинающеся с RASQSISNNLH, KSSQSLLNSGNQKNYM, или эквивалента каждой из них, за которыми следуют дополнительные 50 аминокислот или, альтернативно, примерно 40 аминокислот или, альтернативно, примерно 30 аминокислот или, альтернативно, примерно 20 аминокислот или, альтернативно, примерно 10 аминокислот или, альтернативно, примерно 5 аминокислот или, альтернативно, примерно 4 или 3 или 2 или 1 аминокислота на карбокси-конце.

В некоторых вариантах осуществления, вариабельная область легкой цепи содержит CDRL2 последовательность, содержащую или, альтернативно, состоящую по существу из или, также дополнительно состоящую из, аминокислотной последовательности, начинающеся с YASQSIS, GASTRES, или эквивалента каждой из них, за которыми следуют дополнительные 50 аминокислот или, альтернативно, примерно

40 аминокислот или, альтернативно, примерно 30 аминокислот или, альтернативно, примерно 20 аминокислот или, альтернативно, примерно 10 аминокислот или, альтернативно, примерно 5 аминокислот или, альтернативно, примерно 4 или 3 или 2 или 1 аминокислота на карбокси-конце.

В некоторых вариантах осуществления, вариабельная область легкой цепи содержит CDRL3 последовательность, содержащую или, альтернативно, состоящую по существу из или, также дополнительно состоящую из, аминокислотной последовательности, начинающеся с QQSNTWPYT, QNDHSYPLT, или эквивалента каждой из них, за которыми следуют дополнительные 50 аминокислот или, альтернативно, примерно 40 аминокислот или, альтернативно, примерно 30 аминокислот или, альтернативно, примерно 20 аминокислот или, альтернативно, примерно 10 аминокислот или, альтернативно, примерно 5 аминокислот или, альтернативно, примерно 4 или 3 или 2 или 1 аминокислота на карбокси-конце.

В другом аспекте настоящего описания, антигенсвязывающий домен FLT3 антитела включает одну или несколько из следующих характеристик:

(a) последовательность вариабельного домена легкой цепи иммуноглобулина содержит одну или несколько CDR, которые, по меньшей мере, на 80% идентичны CDR вариабельного домена легкой цепи любой из раскрытых последовательностей легкой цепи;

(b) последовательность вариабельного домена тяжелой цепи иммуноглобулина содержит одну или несколько CDR, которые, по меньшей мере, на 80% идентичны CDR вариабельного домена тяжелой цепи любой из раскрытых последовательностей тяжелой цепи;

(c) последовательность вариабельного домена легкой цепи иммуноглобулина на, по меньшей мере, 80% идентична вариабельному домену легкой цепи любой из раскрытых последовательностей легкой цепи;

(d) последовательность вариабельного домена НС иммуноглобулина на, по меньшей мере, 80% идентична вариабельному домену тяжелой цепи любой из раскрытых последовательностей тяжелой цепи; и

(e) антитело связывает эпитоп, который перекрывается с эпитопом, связанным любой из раскрытых последовательностей.

Дополнительные примеры эквивалентов включают пептид, имеющий, по меньшей мере, 85% или, альтернативно, по меньшей мере, 90% или, альтернативно, по меньшей мере, 95% или, альтернативно, по меньшей мере, 97% идентичность аминокислоты к пептиду или полипептиду, который является кодирован полинуклеотидом, который гибридизуется в условиях высокой жесткости с комплементом полинуклеотида, кодирующего антигенсвязывающий домен, где условия высокой жесткости включают температуры инкубации от примерно 55°C до примерно 68°C; концентрации буфера от примерно 1x SSC до примерно 0,1x SSC; концентрации формамида от примерно 55% до примерно 75%; и промывочные растворы примерно 1x SSC, 0,1x SSC или

деионизированную воду.

Типовые антигенсвязывающие домены могут содержать один или более из указанных ниже пептидов и, в одном аспекте, могут содержать все три CDR указанных HC и LC для конкретного антигена, раскрытого в **Таблице 1**, или полинуклеотиды, кодирующие FLT3вариабельные области HC и LC, указанные ниже в **Таблице 1**.

Таблица 1

АНТИ-FLT3 АНТИТЕЛО	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
FLT3-1	SYWMH	EIDPSDSYKDYNQKFKD	AITTTPFDF	RASQSISNNLH	YASQSIS	QQSNTWPYT
FLT3-2	NYGLH	VIWSGGSTDYNAAFIS	GGIYYANHYYAMDY	KSSQSLLNSGNQKNYM	GASTRES	QNDHSYPLT

Полинуклеотидная последовательность FLT3-1 переменной области тяжелой цепи:

CAGGTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTTGTGAAGCCTGGGGCTTCAT
TGAAGCTGTCCTGCAAGTCTTCCGGGTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGG
TGAGGCAGAGGCCTGGACATGGCCTTGAGTGGATCGGAGAGATTGATCCTTCTGAC
AGTTATAAAGACTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTGGACAG
ATCCTCCAACACAGCCTACATGCACCTCAGCAGCCTGACATCTGATGACTCTGCGGT
CTATTATTGTGCAAGAGCGATTACGACGACCCCCTTTGACTTCTGGGGCCAAGGCAC
CACTCTCACAGTCTCCTCA или ее эквивалент.

Полинуклеотидная последовательность FLT3-1 переменной области легкой цепи:

GATATTGTGCTAACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGATAG
CGTCAGTCTTTCCTGCAGGGCCAGCCAGAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTATCA
ACAAAAATCACATGAGTCTCCAAGGCTTCTCATCAAGTATGCTTCCCAGTCCATCTC
TGGGATCCCCTCCAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCTCAGTAT
CAACAGTGTGGAGACTGAAGATTTTGGAGTGTATTTCTGTCAACAGAGTAACACCTG
GCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG или ее эквивалент.

Полинуклеотидная последовательность FLT3-2 переменной области тяжелой цепи:

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCC
TGTCCATCACCTGCACAGTCTCTGGTTTCTCATTAACTAACTATGGTTTACACTGGGT
TCGCCAGTCTCCAGGAAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGAGTGATATGGAGTGGTGGAA
GCACAGACTATAATGCAGCTTTCATATCCAGACTGAGCATCAGCAAGGACAACTCC
AAGAGCCAAGTTTTCTTTAAAATGAACAGTCTGCAGGCTGATGACACAGCCATATAC
TACTGTGCCAGAAAAGGAGGGATCTACTATGCTAACCATTACTATGCTATGGACTAC

TGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA или ее эквивалент.

Полинуклеотидная последовательность FLT3-2 переменной области легкой цепи:

GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGAGTGTGTCAGCAGGAGAGA AGGTCACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAAACAGTGGAAATCAAAAG AACTATATGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCTAAACTGTTGATCTAC GGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGG AACCGATTTCACTCTTACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTA CTGTCAGAATGATCATAGTTATCCGCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCT GAAACGG или ее эквивалент.

Дополнительные не ограничивающие примеры аминокислотных последовательностей FLT3 CDR домена описаны в таблицах 1-4 Заявки на патент США №: US20180346601, таблице V Заявки на патент США №: US20180037657, таблице 10 Заявки на патент США №: US20170037149, таблице V Заявки на патент США №: US20160272716, таблицах 1-3 Заявки на патент США №: US20110091470 и таблицах 1-3 Заявки на патент США №: US20090297529.

Неограничивающие примеры аминокислотных последовательностей FLT3 переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи описаны в таблицах 1 и 3 Заявки на патент США №: US20180346601, таблице X Заявки на патент США №: US20180037657, таблице 10 Заявки на патент США №: US20170037149 и таблице VII Заявки на патент США №: US20160272716.

В одном аспекте, в настоящем описании представлен антигенсвязывающий домен антитела, который на, по меньшей мере, 80%, или, альтернативно, 85% или, альтернативно, 90% или, альтернативно, 95% или, альтернативно, по меньшей мере, 97% идентичен FLT3-1. Дополнительные примеры эквивалентов включают полипептид, который кодирован полинуклеотидом, который гибридизуется в условиях высокой жесткости с комплементом полинуклеотида, кодирующего последовательность нуклеиновой кислоты антигенсвязывающего домена, где условия высокой жесткости включают температуры инкубации от примерно 55°C до примерно 68°C; концентрации буфера от примерно 1x SSC до примерно 0,1x SSC; концентрации формамида от примерно 55% до примерно 75%; и промывочные растворы примерно 1x SSC, 0,1x SSC или деионизированную воду.

В некоторых аспектах антител, представленных в настоящем документе, последовательность вариабельного домена HC включает последовательность вариабельного домена FLT3-1, а последовательность вариабельного домена LC содержит последовательность вариабельного домена FLT3-1.

В одном аспекте, в настоящем описании представлен антигенсвязывающий домен антитела, содержащий CDR FLT3-1. В одном аспекте, настоящее описание представляет антигенсвязывающий домен антитела, который на, по меньшей мере, 80%, или, альтернативно, 85% или, альтернативно, 90% или, альтернативно, 95% или, альтернативно, по меньшей мере, 97% идентичен CDR FLT3-1, или полипептид, который

кодирован полинуклеотидом, который гибридизуется в условиях высокой жесткости с комплементом полинуклеотида, кодирующего последовательность нуклеиновой кислоты CDR FLT3, где условия высокой жесткости включают температуры инкубации от примерно 55°C до примерно 68°C; концентрации буфера от примерно 1x SSC до примерно 0,1x SSC; концентрации формамида от примерно 55% до примерно 75%; и промывочные растворы примерно 1x SSC, 0,1x SSC или деионизированную воду.

В одном аспекте, в настоящем описании представлен антигенсвязывающий домен антитела, который на, по меньшей мере, 80%, или, альтернативно, 85% или, альтернативно, 90% или, альтернативно, 95% или, альтернативно, по меньшей мере, 97% идентичен FLT3-2. Дополнительные примеры эквивалентов включают полипептид, который кодирован полинуклеотидом, который гибридизуется в условиях высокой жесткости с комплементом полинуклеотида, кодирующего последовательность нуклеиновой кислоты антигенсвязывающего домена, где условия высокой жесткости включают температуры инкубации от примерно 55°C до примерно 68°C; концентрации буфера от примерно 1x SSC до примерно 0,1x SSC; концентрации формамида от примерно 55% до примерно 75%; и промывочные растворы примерно 1x SSC, 0,1x SSC или деионизированную воду.

В некоторых аспектах антител, представленных в настоящем документе, последовательность вариабельного домена HC включает последовательность вариабельного домена FLT3-2, а последовательность вариабельного домена LC содержит последовательность вариабельного домена FLT3-2.

В одном аспекте, в настоящем описании представлен антигенсвязывающий домен антитела, содержащий CDR FLT3-2. В одном аспекте, настоящее описание представляет антигенсвязывающий домен антитела, который на, по меньшей мере, 80%, или, альтернативно, 85% или, альтернативно, 90% или, альтернативно, 95% или, альтернативно, по меньшей мере, 97% идентичен CDR FLT3-2, или полипептид, который кодирован полинуклеотидом, который гибридизуется в условиях высокой жесткости с комплементом полинуклеотида, кодирующего последовательность нуклеиновой кислоты CDR FLT3, где условия высокой жесткости включают температуры инкубации от примерно 55°C до примерно 68°C; концентрации буфера от примерно 1x SSC до примерно 0,1x SSC; концентрации формамида от примерно 55% до примерно 75%; и промывочные растворы примерно 1x SSC, 0,1x SSC или деионизированную воду.

Трансмембранный домен. Трансмембранный домен может быть получен либо из природного, либо из синтетического источника. Если источник является природным, домен может быть получен из любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. Трансмембранные области, конкретно применяемые в настоящем описании, могут быть получены из CD8, CD28, CD3, CD45, CD4, CD5, CDS, CD9, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD 154, TCR. Альтернативно, трансмембранный домен может быть синтетическим, в этом случае он будет содержать преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. Предпочтительно, триплет

фенилаланина, триптофана и валина будет обнаружен на каждом конце синтетического трансмембранного домена. Необязательно, короткий олиго- или полипептидный линкер, предпочтительно, длиной от 2 до10 аминокислот, может образовывать связь между трансмембранным доменом и цитоплазматическим доменом CAR. Дублет глицин-серин преставляет особенно подходящий линкер.

Цитоплазматический домен. Цитоплазматический домен или внутриклеточный сигнальный домен CAR отвечает за активацию, по меньшей мере, одной из традиционных эффекторных функций иммунной клетки, в которую помещен CAR. Внутриклеточный сигнальный домен относится к части белка, который передает сигнал эффекторной функции и направляет иммунную клетку на выполнение своей специфической функции. Можно использовать весь сигнальный домен или его усеченную часть, если усеченной части достаточно для трансдукции сигнала эффекторной функции. Цитоплазматические последовательности TCR и корецепторов, а также их производные или варианты, могут функционировать как внутриклеточные сигнальные домены для использования в CAR. Внутриклеточные сигнальные домены, особенно используемые в данном описании, могут быть получены из FcR, TCR, CD3, CDS, CD22, CD79a, CD79b, CD66d. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный домен CAR может содержать CD3 ζ сигнальный домен.

Поскольку сигналов, генерируемых только через TCR, недостаточно для полной активации Т-клетки, может также потребоваться вторичный или костимулирующий сигнал. Таким образом, внутриклеточная область костимулирующей сигнальной молекулы, включая, но не ограничиваясь ими, внутриклеточные домены белков CD27, CD28, 4-IBB (CD 137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, функционально связанного антигена лимфоцитов-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 или лиганда, который специфически связывается с CD83, также могут быть включены в цитоплазматический домен CAR. Например, CAR может содержать один, два или несколько костимулирующих доменов, в дополнение к сигнальному домену (например, CD3 ζ сигнальному домену).

В некоторых вариантах осуществления, группой клеточной активации химерного антигенного рецептора является сигнальный домен Т-клетки, содержащий или альтернативно, состоящий по существу, или состоящий из одного или нескольких белков или их фрагментов, выбранных из группы, состоящей из CD8 белка, CD28 белка, 4-1BB белка, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, CD27, LIGHT, NKG2C, B7-H3 и CD3-дзета белка.

В конкретных вариантах осуществления, CAR содержит, или альтернативно, состоит по существу из или, дополнительно, состоит из антигенсвязывающего домена FLT3 антитела (например, scFv), шарнирного домена, CD28 трансмембранного домена, костимулирующей сигнальной области и CD3 дзета сигнального домена. В других вариантах осуществления, костимулирующая сигнальная область содержит одну или обе CD28 костимулирующую сигнальную область и 4-1BB костимулирующую сигнальную область.

Механизмы переключения. В некоторых вариантах осуществления, CAR может также содержать механизм переключения для контроля экспрессии и/или активации CAR. Например, CAR может содержать, состоять или состоять по существу из внеклеточного, трансмембранного и внутриклеточного домена, в котором внеклеточный домен содержит мишень-специфичный связывающий элемент, который связывает метку, связывающий домен или метку, специфичную для молекулы, отличной от антигена-мишени, которая экспрессируется на или клеткой-мишенью. В таких вариантах осуществления, специфичность CAR обеспечивается вторым конструктом, который включает, состоит или состоит по существу из антигенсвязывающего домена-мишени (например, анти-FLT3-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифического антитела, которое связывает FLT3 и метку или тег на CAR) и домена, который распознается или связывается с меткой, связывающим доменом или тегом на CAR. См., например, WO 2013/044225, WO 2016/000304, WO 2015/057834, WO 2015/057852, WO 2016/070061, US 9,233,125, US 2016/0129109. Таким образом, клетка, экспрессирующая CAR, может быть введена субъекту, но она не может связывать свой антигеном-мишень (т.е. FLT3) до тех пор, пока не будет введена вторая композиция, содержащая FLT3-специфический связывающий домен.

CAR по настоящему раскрытию могут также потребовать мультимеризации, чтобы активировать свою функцию (см., например, US 2015/0368342,US 2016/0175359, US 2015/0368360) и/или an экзогенного сигнала, такого как низкомолекулярное лекарственное средство (US 2016/0166613, Yung et al., Science, 2015) для вызова Т-клеточного ответа.

Более того, раскрытые CAR могут содержать «переключатель самоубийства» (также называемый «ген самоубийства») для вызова гибели клетки CAR после лечения (Buddee et al., PLoS One, 2013) или для подавления экспрессии CAR после связывания с антигеном-мишенью (WO 2016/011210). Неограничивающим типовым переключателем самоубийства или геном самоубийства является iCasp. Переключатель самоубийства может направляться индуцируемым промотором.

В одном аспекте, CAR по настоящему описанию может дополнительно содержать, или альтернативно, состоять по существу, или также состоять из индуцируемого или конститутивно активного элемента. В одном варианте осуществления, индуцируемый или конститутивно активный элемент контролирует экспрессию полинуклеотида, кодирующего иммунорегуляторные молекулы или цитокин. Иммунорегуляторная молекула или цитокин может содержать, или, альтернативно, состоять по существу из, или также дополнительно состоять из одного или нескольких из B7.1, CCL19, CCL21, CD40L, CD137L, GITRL, GM-CSF, IL-12, IL-2, низкотоксичного IL-2, IL-15, IL-18, IL-21, LEC и/или OX40L. В другом аспекте, иммунорегуляторная молекула или цитокин может содержать, или, альтернативно, состоять по существу из, или также дополнительно состоять из IL-12 и/или GM-CSF; и/или IL-12 и/или одного или нескольких из IL-2 и низкотоксичного IL-2; и/или IL-12 и/или IL-15; и/или IL-12 и/или IL-21; IL-12 и/или B7.1; и/или IL-12 и/или OX40L; и/или IL-12 и/или CD40L; и/или IL-12 и/или GITRL; и/или IL-12

и/или IL-18; и/или одного или нескольких из IL-2 и низкотоксичного IL-2 и одного или нескольких из CCL19, CCL21 и LEC; и/или IL-15 и одного или нескольких из CCL19, CCL21 и LEC; и/или IL-21 и одного или нескольких из CCL19, CCL21 и LEC; и/или GM-CSF и одного или нескольких из CCL19, CCL21 и LEC; и/или OX40L и одного или нескольких из CCL19, CCL21 и LEC; и/или CD137L и одного или нескольких из CCL19, CCL21 и LEC; и/или содержит B7.1 и одного или нескольких из CCL19, CCL21 и LEC; и/или CD40L и одного или нескольких из CCL19, CCL21 и LEC; и/или GITRL и одного или нескольких из CCL19, CCL21 и LEC.

В некоторых вариантах осуществления, CAR может дополнительно содержать определяемый маркер или маркер очистки. В другом аспекте, CAR, описанные в настоящем документе, содержатся в композиции, например, фармацевтически приемлемом носителе для диагностики или терапии.

Антитела и способ получения FLT3, PD-1 и PD-L1 антител

Дополнительно в настоящем документе представлены антитела, содержащие или, альтернативно, состоящие по существу из, или, также дополнительно состоящие из последовательности одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), содержащей или, альтернативно, состоящей по существу из, или, также дополнительно состоящей из аминокислотной последовательности (QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNG GTNFNEKFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQG TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPAT FGQGTKVEIKR) или ее эквивалента. В одном аспекте, антитело, содержащее или, альтернативно, состоящее по существу из, или, также дополнительно состоящее из последовательности одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv) кодировано нуклеотидной последовательностью, содержащей или, альтернативно, состоящей по существу из, или, также дополнительно состоящей из а последовательности нуклеиновой кислоты:

(CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGCGTTA
AAGTTTCTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGGGTAC
GGCAGGCTCCAGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAACGGC
GGCACTAACTTTAACGAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAACTGACTCAAG
TACGACTACAGCATACATGGAACTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTGTCTA
TTATTGCGCGAGAAGAGACTATCGCTTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGCAAGG
TACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGGTGGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTCAGGTG
GAGGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCCCCAAGCTCTCTGTCCGCGTCAGTGG
GCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAGATGTGTCAACCGCTGTCGCCT
GGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCCTAAGCTTCTCATCTACTCAGCTTCTTTTC
TGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGGACGGACTTCACAT
TGACCATAAGTTCCTTGCAGCCTGAGGATTTCGCTACATATTATTGCCAACAGTACC

TTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG) или ее эквиваленте. В одном аспекте, антигенсвязывающий домен имеет аффинность связывания с PD-1, которая, по меньшей мере, примерно в 10^6, 10^7, 10^8 или 10^9 раз больше, чем аффинность связывания с молекулой, не родственной PD-1. Также в настоящем документе описаны антитела, содержащие или, альтернативно, состоящие по существу из, или, также дополнительно состоящие из последовательности одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv) содержащей или, альтернативно, состоящей по существу из, или, также дополнительно состоящей из аминокислотной последовательности: (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGST YYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVT VSAGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQ QKPGEAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTF GGGTKVEIK) или ее эквивалента. В одном аспекте, антитело содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из последовательности одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), кодированной нуклеотидной последовательностью, содержащей или, альтернативно, состоящей по существу из, или, также дополнительно состоящей из последовательности нуклеиновой кислоты:
(GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCACTCCG
GTTGTCCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGTGCGC
CAAGCCCCGGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGGGTTC
CACCTACTATGCTGATTCAGTAAAAGGACGGTTCACTATAAGCGCGGATACAAGTA
AGAATACTGCCTATCTTCAAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTATATT
ATTGCGCTAGACGACATTGGCCAGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTTG
TGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGGCAGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGTGGT
TCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCCACATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAGAGA
GCAACTCTGTCATGCCGGGCGTCAAAAGGTGTCAGTACGTCAGGCTACTCCTATCTT
CATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCTTCTCATATACCTGGCTAGT
TACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGGTCTGGGACTGATTTT
ACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACTATTGCCAACAT
TCACGCGATTTGCCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTTGAAATAAAA) или ее эквивалента. В одном аспекте, антигенсвязывающий домен имеет аффинность связывания с PD-L1, которая, по меньшей мере, примерно в 10^6, 10^7, 10^8 или 10^9 раз больше, чем его аффинность связывания с молекулой, не родственной PD-L1.

Также в настоящем документе описано биспецифическое антитело, содержащее или, альтернативно, состоящее по существу из, или, также дополнительно состоящее из последовательности одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), содержащей или, альтернативно, состоящей по существу из, или, также дополнительно состоящей из аминокислотной последовательности: (QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNG

GTNFNEKFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQG
TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWY
QQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPAT
FGQGTKVEIKR) и/или,
(EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGST
YYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVT
VSAGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQ
QKPGEAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTF
GGGTKVEIK) или эквивалента каждой из них. В одном аспекте, биспецифическое антитело содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из последовательности одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), кодированной нуклеотидной последовательностью, содержащей или, альтернативно, состоящей по существу из, или, также дополнительно состоящей из а последовательности нуклеиновой кислоты:
(CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGCGTTA
AAGTTTCTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGGGTAC
GGCAGGCTCCAGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAACGGC
GGCACTAACTTTAACGAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAACTGACTCAAG
TACGACTACAGCATACATGGAACTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTGTCTA
TTATTGCGCGAGAAGAGACTATCGCTTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGCAAGG
TACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGGTGGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTCAGGTG
GAGGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCCCCAAGCTCTCTGTCCGCGTCAGTGG
GCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAGATGTGTCAACCGCTGTCGCCT
GGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCCTAAGCTTCTCATCTACTCAGCTTCTTTTC
TGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGGACGGACTTCACAT
TGACCATAAGTTCCTTGCAGCCTGAGGATTTCGCTACATATTATTGCCAACAGTACC
TTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG) и/или
(GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCACTCCG
GTTGTCCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGTGCGC
CAAGCCCCGGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGGGTTC
CACCTACTATGCTGATTCAGTAAAAGGACGGTTCACTATAAGCGCGGATACAAGTA
AGAATACTGCCTATCTTCAAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTATATT
ATTGCGCTAGACGACATTGGCCAGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTTG
TGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGGCAGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGTGGT
TCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCCACATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAGAGA
GCAACTCTGTCATGCCGGGCGTCAAAAGGTGTCAGTACGTCAGGCTACTCCTATCTT
CATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCTTCTCATATACCTGGCTAGT
TACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGGTCTGGGACTGATTTT
ACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACTATTGCCAACAT
TCACGCGATTTGCCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTTGAAATAAAA) или

эквивалента каждой из них. В одном аспекте, антигенсвязывающий домен имеет аффинность связывания с PD-1 и/или PD-L1, которая, по меньшей мере, примерно в 10^6, 10^7, 10^8 или 10^9 раз больше, чем его аффинность связывания для молекулы, не родственной к PD-1 и/или PD-L1. Антителом может быть IgA, IgD, IgE, IgG или IgM антитело. В одном конкретном аспекте, антитело содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из константной области. Константная область может содержать, или, альтернативно, состоять в основном из, или дополнительно состоять из IgA, IgD, IgE, IgG или IgM константной области. В некоторых вариантах осуществления, константной областью является IgG1 константная область или Ig каппа константная область. В определенных вариантах осуществления, константные области содержат, или, альтернативно, состоят по существу из или дополнительно состоят из аминокислотных последовательностей, представленных ниже:

Константная область IgD человека, Uniprot: P01880

APTKAPDVFPIISGCRHPKDNSPVVLACLITGYHPTSVTVTWYMGTQSQPQRTFP
EIQRRDSYYMTSSQLSTPLQQWRQGEYKCVVQHTASKSKKEIFRWPESPKAQASSVPTA
QPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLL
TPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQ
HSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAQAPVKLSLNLLASSDPPEAAS
WLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQP
ATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYVTDHGPMK

Константная область IgG1 человека, Uniprot: P01857

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Константная область IgG2 человека, Uniprot: P01859

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPV
AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Константная область IgG3 человека, Uniprot: P01860

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCP
EPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL

TCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFS
CSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

Константная область IgM человека, Uniprot: P01871

GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITLSWKYKNNSDISSTRGF
PSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVS
VFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSGVTTDQVQAEAKESGP
TTYKVTSTLTIKESDWLGQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFAS
IFLTKSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDD
WNSGERFTCTVTHTDLPSPLKQTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVT
GFSPADVFVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGETYTC
VAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY

Константная область IgG4 человека, Uniprot: P01861

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV
DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

Константная область IgA1 человека, Uniprot: P01876

ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACLVQGFFPQEPLSVTWSESGQGVTARNFPPS
QDASGDLYTTSSQLTLPATQCLAGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPCPVPSTPPTPSPSTPP
TPSPSCCHPRLSLHRPALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGVTFTWTPSSGKSAVQGPPE
RDLCGCYSVSSVLPGCAEPWNHGKTFTCTAAYPESKTPLTATLSKSGNTFRPEVHLLPPP
SEELALNELVTLTCLARGFSPKDVLVRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTFAVT
SILRVAAEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY

Константная область IgA2 человека, Uniprot: P01877

ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACLVQGFFPQEPLSVTWSESGQNVTARNFPP
SQDASGDLYTTSSQLTLPATQCPDGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPCPVPPPPPCCHPRLS
LHRPALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVQGPPERDLCGCYSVSS
VLPGCAQPWNHGETFTCTAAHPELKTPLTANITKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVT
LTCLARGFSPKDVLVRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTFAVTSILRVAAEDW
KKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRMAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY

Константная область Ig каппа человека, Uniprot: P01834

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Это раскрытие также относится к антителам, которые конкурируют за связывание с антителами, описанными здесь. Антитело по настоящему описанию может быть поликлональным, моноклональным или гуманизированным антителом. Также в настоящем документе представлены антигенсвязывающие фрагменты антител по настоящему описанию. Антигенсвязывающий фрагмент может быть выбран из группы,

состоящей из Fab, F(ab')2, Fab', scFv и Fv. В одном аспекте, антигенсвязывающий фрагмент может содержать, или, альтернативно, состоять в основном из, или дополнительно состоять из аминокислотной последовательности (QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNG GTNFNEKFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQG TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPAT FGQGTKVEIKR) или ее эквивалента. Антигенсвязывающий фрагмент может быть кодирован нуклеотидной последовательностью содержащей или, альтернативно, состоящей по существу из, или, также дополнительно состоящей из последовательности нуклеиновой кислоты: (CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGCGTTA AAGTTTCTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGGGTAC GGCAGGCTCCAGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAACGGC GGCACTAACTTTAACGAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAACTGACTCAAG TACGACTACAGCATACATGGAACTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTGTCTA TTATTGCGCGAGAAGAGACTATCGCTTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGCAAGG TACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGGTGGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTCAGGTG GAGGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCCCCAAGCTCTCTGTCCGCGTCAGTGG GCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAGATGTGTCAACCGCTGTCGCCT GGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCCTAAGCTTCTCATCTACTCAGCTTCTTTTC TGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGGACGGACTTCACAT TGACCATAAGTTCCTTGCAGCCTGAGGATTTCGCTACATATTATTGCCAACAGTACC TTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG) или эквивалента каждой из них. В другом аспекте, антигенсвязывающий фрагмент может содержать, или, альтернативно, состоять в основном из, или дополнительно состоять из аминокислотной последовательности: (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGST YYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVT VSAGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQ QKPGEAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTF GGGTKVEIK) или эквивалента каждой из них. Антигенсвязывающий фрагмент может быть кодирован нуклеотидной последовательностью, содержащей или, альтернативно, состоящей по существу из, или, также дополнительно состоящей из последовательности нуклеиновой кислоты: (GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCACTCCG GTTGTCCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGTGCGC CAAGCCCCGGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGGGTTC CACCTACTATGCTGATTCAGTAAAAGGACGGTTCACTATAAGCGCGGATACAAGTA AGAATACTGCCTATCTTCAAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTATATT

ATTGCGCTAGACGACATTGGCCAGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTTG
TGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGGCAGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGTGGT
TCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCCACATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAGAGA
GCAACTCTGTCATGCCGGGCGTCAAAAGGTGTCAGTACGTCAGGCTACTCCTATCTT
CATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCTTCTCATATACCTGGCTAGT
TACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGGTCTGGGACTGATTTT
ACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACTATTGCCAACAT
TCACGCGATTTGCCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTTGAAATAAAA) или эквивалента каждой из них. Также в настоящем документе описаны полипептиды, содержащие или, альтернативно, состоящие по существу из, или, также дополнительно состоящие из аминокислотной последовательности любой из: 45
(QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNG
GTNFNEKFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQG
TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWY
QQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPAT
FGQGTKVEIKR) или
(EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGST
YYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVT
VSAGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQ
QKPGEAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTF
GGGTKVEIK) или эквивалента каждой из них. Это описание дополнительно относится к выделенным нуклеиновым кислотам, содержащим или, альтернативно, состоящим по существу из, или, также дополнительно состоящим из последовательности нуклеиновой кислоты, любой из:
(CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGCGTTA
AAGTTTCTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGGGTAC
GGCAGGCTCCAGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAACGGC
GGCACTAACTTTAACGAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAACTGACTCAAG
TACGACTACAGCATACATGGAACTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTGTCTA
TTATTGCGCGAGAAGAGACTATCGCTTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGCAAGG
TACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGGTGGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTCAGGTG
GAGGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCCCCAAGCTCTCTGTCCGCGTCAGTGG
GCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAGATGTGTCAACCGCTGTCGCCT
GGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCCTAAGCTTCTCATCTACTCAGCTTCTTTTC
TGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGGACGGACTTCACAT
TGACCATAAGTTCCTTGCAGCCTGAGGATTTCGCTACATATTATTGCCAACAGTACC
TTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG) или
(GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCACTCCG
GTTGTCCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGTGCGC
CAAGCCCCGGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGGGTTC

CACCTACTATGCTGATTCAGTAAAAGGACGGTTCACTATAAGCGCGGATACAAGTA
AGAATACTGCCTATCTTCAAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTATATT
ATTGCGCTAGACGACATTGGCCAGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTTG
TGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGGCAGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGTGGT
TCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCCACATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAGAGA
GCAACTCTGTCATGCCGGGCGTCAAAAGGTGTCAGTACGTCAGGCTACTCCTATCTT
CATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCTTCTCATATACCTGGCTAGT
TACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGGTCTGGGACTGATTTT
ACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACTATTGCCAACAT
TCACGCGATTTGCCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTTGAAATAAAA) или эквивалента каждой из них.

Также в настоящем документе представлены выделенные клетки, содержащие или, альтернативно, состоящие по существу из или состоящие из антител по настоящему описанию. В одном аспекте, антитела по настоящему описанию экспрессированы в выделенных клетках. Клеткой может быть прокариотическая или эукариотическая клетка и ее необязательно выбирают из животной клетки, клетки млекопитающего, клетки коровы, клетки кошки, клетки собаки, клетки мыши, клетки лошади или клетки человека. В некоторых вариантах осуществления, эукариотической клеткой является иммунная клетка, необязательно, Т-клетка, В-клетка, NK-клетка, дендритная клетка, миелоидная клетка, моноцит или макрофаг. В других вариантах осуществления, иммунной клеткой является Т-клетка, которая может быть необязательно модифицирована для подавления эндогенной экспрессии TCR, с применением любой подходящей системы, например, CRISPR системы. В любом из представленных выше вариантов осуществления, относящихся к выделенной клетке, выделенная клетка экспрессирует CAR на клеточной поверхности и секретирует антитело, содержащее антигенсвязывающий домен, который распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент, необязательно биспецифическое антитело.

Антитела для использования в этом раскрытии могут быть приобретены или получены с использованием способов, известных в данной области техники и кратко описанных здесь. В некоторых аспектах может быть желательно продуцировать антитело, специфичное к антигену, экспрессируемому клеткой-мишенью, которая может быть выделена у пациента для специализированной персонализированной терапии. Их производство и использование хорошо известны и раскрыты в, например, Greenfield (2014) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Антитела могут быть созданы с применением стандартных способов, известных в данной области техники. Примеры антител включают (но не ограничены ими) моноклональные, одноцепочечные и функциональные фрагменты антител.

Антитела могут вырабатываться у ряда хозяев, например у коз, кроликов, крыс, мышей, людей и других. Они могут быть иммунизированы инъекцией антигена-мишени или его фрагмента или олигопептида, который обладает иммуногенными свойствами,

например С-концевого фрагмента FLT3, PD-1 или PD-L1, или изолированного полипептида. В зависимости от вида хозяина могут быть добавлены различные адъюванты и использованы для усиления иммунологического ответа. Такие адъюванты включают, но не ограничиваются ими, минеральные гели Фрейнда, такие как гидроксид алюминия, и поверхностно-активные вещества, такие как лизолецитин, полиолы Pluronic, полианионы, пептиды, масляные эмульсии, гемоцианин лимфы улитки и динитрофенол. Среди адъювантов, применяемых у человека, особенно полезными являются BCG (бацилла Кальмета-Герена) и Corynebacterium parvum. Это раскрытие также представляет изолированный полипептид и адъювант.

В определенных аспектах, антитела настоящего раскрытия являются поликлональными, то есть смесью нескольких типов FLT3, PD-1 или PD-L1 антител, имеющих разные аминокислотные последовательности. В одном аспекте, поликлональное антитело содержит смесь множества типов FLT3, PD-1 или PD-L1 антител, имеющих разные CDR. По существу, культивируют смесь клеток, продуцирующих различные антитела, и могут применяться антитела, очищенные из полученной культуры (см. WO 2004/061104).

Продуцирование моноклональных антител. Моноклональные антитела к FLT3, PD-1 или PD-L1 антигену могут быть получены с использованием любого метода, который обеспечивает продуцирование молекул антител непрерывными клеточными линиями в культуре, и в одном аспекте, создаются для специального связывания антигена, выделенного у субъекта, которого лечат. Такие методы включают, но не ограничиваются ими, метод гибридомы (см., например, Kohler & Milstein (1975) Nature 256: 495-497); метод триомы; метод В-клеточной гибридомы человека (см., например, Kozbor et al. (1983) Immunol. Today 4: 72) и метод EBV гибридомы для продуцирования моноклональных антител человека (см., например, Cole et al. (1985) in: MONOCLONAL ANTIBODIES and CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Моноклональные антитела человека могут применяться на практике настоящего метода, и могут быть продуцированы с применением гибридом человека (см., например, Cote et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80: 2026-2030) или трансформацией В-клеток человека с вирусом Эпштейн-Барр in vitro (см., например, Cole et al. (1985) in: MONOCLONAL ANTIBODIES and CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Например, может быть выделена популяция нуклеиновых кислот, кодирующих области антитела. ПЦР с использованием праймеров, полученных из последовательностей, кодирующих консервативные области антитела, используют для амплификации последовательностей, кодирующих части антитела из популяции, и затем реконструируют ДНК, кодирующие антитела или их фрагменты, такие как вариабельные домены, из амплифицированных последовательностей. Такие амплифицированные последовательности также могут быть слиты с ДНК, кодирующей другие белки, например оболочку бактериофага или поверхностный белок бактериальной клетки, для экспрессии и дисплея слитых полипептидов на фаге или бактериях. Затем амплифицированные антитела могут быть

экспрессированы и далее выбраны или выделены на основе, например, аффинности экспрессируемого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента к антигену или эпитопу, присутствующему на антигенном полипептиде FLT3, PD-1 или PD-L1. Альтернативно гибридомы, экспрессирующие FLT3 моноклональные антитела, могут быть получены иммунизацией субъекта, например, изолированным полипептидом, содержащим или альтернативно, состоящим по существу, или, также, дополнительно состоящим из аминокислотной последовательности FLT3, PD-1 или PD-L1-антигена или его фрагмента, и затем выделением гибридом из селезенки субъекта с использованием обычных методов. См., например, Milstein et al., (Galfre and Milstein (1981) Methods Enzymol 73:3-46). Скрининг гибридом с использованием стандартных способов будет давать моноклональные антитела различной специфичности (т.е. для разных эпитопов) и аффинности. Выбранное моноклональное антитело с желаемыми свойствами, например, связывание антигена FLT3PD-1 или PD-L1, можно (i) использовать, в том виде, в котором оно экспрессируется гибридомой, (ii) связать с молекулой, такой как полиэтиленгликоль (ПЭГ), чтобы изменить его свойства, или (iii) изолировать, секвенировать и обработать разными способами кДНК, кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты моноклонального антитела. В одном аспекте, FLT3 моноклональное антителе продуцируется гибридомой, которая включает В-клетку, полученную от трансгенного животного, отличного от человека, например трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий трансген тяжелой цепи и трансген легкой цепи человека, слитый с иммортализованной клеткой. Методы гибридомы включают такие, которые известны в данной области и изложены в Greenfield (2014) Antibodies A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; Hammerling et al. (1981) Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas:563-681.

Метод фагового дисплея. Как отмечалось выше, антитела по настоящему изобретению могут быть получены путем применения технологии рекомбинантной ДНК и фагового дисплея. Например, FLT3, PD-1 или PD-L1 антитела, могут быть получены с использованием различных способов фагового дисплея, известных в данной области. В методах фагового дисплея функциональные домены антител представляются на поверхности фаговой частицы, несущей кодирующие их полинуклеотидные последовательности. Фаг с желаемым свойством связывания выбирают из репертуара или комбинаторной библиотеки антител (например, человека или мыши) путем прямого отбора с антигеном, обычно антигеном, связанным или захваченным на твердой поверхности или шарике. Фаг, используемый в этих способах, обычно представляет собой нитчатый фаг, включающий fd и M13 с Fab, Fv или домены стабилизированного дисульфидом Fv-антитела, рекомбинантно слитые с белком либо гена III, либо гена VIII фага. Кроме того, способы могут быть адаптированы для создания библиотек экспрессии Fab (см., например, Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281) чтобы проводить быструю и эффективную идентификацию фрагментов моноклональных Fab с желаемой специфичностью для FLT3 полипептида, например, полипептида или его производных,

фрагментов, аналогов или гомологов. Другие примеры способов фагового дисплея, которые могут применяться для получения выделенных антител настоящего описания, включают те, которые раскрыты в Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883; Chaudhary et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87:1066-1070; Brinkman et al. (1995) J. Immunol. Methods 182:41-50; Ames et al. (1995) J. Immunol. Methods 184:177-186; Kettleborough et al. (1994) Eur. J. Immunol. 24:952-958; Persic et al. (1997) Gene 187: 9-18; Burton et al. (1994) Advances in Immunology 57:191-280; PCT/GB91/01134; WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; WO 96/06213; WO 92/01047 (Medical Research Council et al.); WO 97/08320 (Morphosys); WO 92/01047 (CAT/MRC); WO 91/17271 (Affymax); и патентах США №№ 5,698,426, 5,223,409, 5,403,484, 5,580,717, 5,427,908, 5,750,753, 5,821,047, 5,571,698, 5,427,908, 5,516,637, 5,780,225, 5,658,727 и 5,733,743.

Способы, используемые для представления полипептидов на поверхности частиц бактериофага через присоединение полипептидов через дисульфидные связи, были описаны Lohning, патент США № 6,753,136. Как описано в приведенных выше ссылках, после отбора фага, кодирующие области антитела из фага могут быть выделены и использованы для создания целых антител, включая антитела человека, или любых других желаемых антигенсвязывающих фрагментов, и экспрессированы в любом желаемом хозяине, включая клетки млекопитающих, клетки насекомых, клетки растений, дрожжи и бактерии. Например, методы рекомбинантного продуцирования Fab, Fab′ и $F(ab')_2$ фрагментов также могут применяться с использованием способов, известных в данной области техники, таких, как описаны в WO 92/22324; Mullinax et al. (1992) BioTechniques 12:864-869; Sawai et al. (1995) AJRI 34:26-34; и Better et al. (1988) Science 240:1041-1043.

Как правило, гибридные антитела или фрагменты гибридных антител, которые клонируются в дисплейный вектор, могут быть отобраны против подходящего антигена, чтобы идентифицировать варианты, которые сохраняют хорошую связывающую активность, поскольку антитело или фрагмент антитела будут присутствовать на поверхности фага или фагмидной частицы. См., например, Barbas III et al. (2001) Phage Display, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Однако для этого процесса можно использовать другие векторные форматы, такие как клонирование библиотеки фрагментов антител в литический фаговый вектор (модифицированные системы T7 или Lambda Zap) для отбора и/или скрининга.

Альтернативные способы продуцирования антитела. Антитела также могут быть получены путем индукции in vivo продуцирования в популяции лимфоцитов или скринингом библиотек рекомбинантных иммуноглобулинов или панелей высокоспецифичных связывающих реагентов (Orlandi et al. (1989) PNAS 86:3833-3837; Winter, G. et al. (1991) Nature 349:293-299).

Альтернативно, могут применяться методы получения одноцепочечных антител. Одноцепочечные антитела (scFv) включают вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, связанную с линкерным пептидом (обычно длиной от

5 до 25 аминокислот). В scFv вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи могут происходить из одного и того же антитела или разных антител. scFv могут быть синтезированы с использованием рекомбинантных методов, например, экспрессией вектора, кодирующего последовательность нуклеиновой кислоты scFv, в организме-хозяине, таком как E. coli. ДНК, кодирующая последовательность нуклеиновой кислоты scFv, может быть получена проведением амплификации с использованием частичной ДНК, кодирующей полную или желаемую аминокислотную последовательность ДНК, выбранной из ДНК, кодирующей тяжелую цепь или вариабельную область тяжелой цепи вышеупомянутого антитела, и ДНК, кодирующей легкую цепь или вариабельную область легкой цепи в качестве матрицы, с помощью ПЦР с использованием пары праймеров, которая определяет оба ее конца, и дальнейшего проведения амплификации, объединяющей ДНК, кодирующую часть полипептидного линкера, и пары праймеров, которая определяет оба их конца, чтобы связать оба конца линкера с тяжелой цепью и легкой цепью соответственно. Вектор экспрессии, содержащий ДНК, кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты scFv, и хозяина, трансформированного вектором экспрессии, можно получить обычными способами, известными в данной области.

Также могут быть созданы антигенсвязывающие фрагменты, например, фрагменты $F(ab')_2$, которые могут быть получены пепсиновым перевароом молекулы антитела, и фрагменты Fab, которые могут быть получены восстановлением дисульфидных мостиков фрагментов $F(ab')_2$. Альтернативно, могут быть сконструированы библиотеки экспрессии Fab, позволяющие быструю и легкую идентификацию фрагментов моноклональных Fab с желаемой специфичностью (Huse et al., Science, 256: 1275-1281 (1989)).

Коммерчески доступные антитела. Антитела также могут быть приобретены из коммерчески доступных источников. Примеры коммерчески доступных FLT3 антител включают, но не ограничены ими, такие, которые произведены поставщиками, такими как Proteintech Group Inc., eBioscience, Abgent, Aviva Systems Biology, Becton Dickinson (Biosciences), Cell Signaling Technology, Fitzgerald Industries International, United States Biological, Biorbyt, Abbexa, Abgent, LifeSpan BioSciences, антитела-онлайн, Rockland Immunochemicals, Inc., OriGene Technologies, GeneTex, Raybiotech, Inc., Acris Antibodies GmbH, Sino Biological, MyBioSource.com, Bioss Inc., St. John's Laboratory, Source BioScicne, Abcam, ProSci, Inc., Clinic Sciences, Novus Biologicals, Creative Diagnostics, Thermo Scientific Pierce Antibodies, PeproTech, MBL International, Miltenyi Biotec, GenWay Biotech, Inc., LifeSpan Biosciences, Bioworld Technology, EXBIO Praha, a.s., Novus Biologicals, BioVision, Bethyl Laboratories, Santa Crus Biotechnology Inc., AbD Serotec, BioRad, BioLegend, Thermo Fisher Scientific, EMD Milipore, R&D Systems, Cell Sciences, Progen Biotechnik GmbH, Spring Bioscience, Atlas Antibodies, Abbiotec, Bostrebio, Nordic BioSite и другие широко известные производители антител. Неограничивающие примеры коммерчески доступных FLT3 антител включают антитела из BV10 и 4G8 клонов и их биологические эквиваленты и модифицированные версии, включая, но не ограничиваясь

ими, следующие коммерчески доступные антитела, перечисленные по производителям и каталожным номерам: антитела-онлайн ABIN487499, антитела-онлайн ABIN487500, LifeSpan Biosciences LS-C179623-100, LifeSpan Biosciences LS-C179624-50, Acris Antibodies AM20042AF-N, Acris Antibodies AM20042FC-N, MBL International K0107-3, MBL International K0107-4, Novus Biologicals NBP1-54522-0.05mg, Novus Biologicals NBP1-54414, Santa Cruz Biotechnology, Inc. sc-21788, Becton Dickinson Biosciences 564708, Becton Dickinson Biosciences 563494. Другие типовые коммерчески доступные антитела включают все антитела, перечисленные как способные взаимодействовать с FLT3 человека в Biocompare или другой базе данных коммерчески доступных антител; неограничивающие примеры включают такие, которые раскрыты в настоящем документе, перечисленные по поставщику и каталожному номеру: Proteintech Group Inc. 21049-1-AP, Proteintech Group Inc. 15827-1-AP, Proteintech Group Inc. 15826-1-AP, eBioscience 17-1357-41, eBioscience 12-1357-41, eBioscience 14-1357-80, eBioscience 17-1357-42, eBioscience 12-1357-42, eBioscience 14-1357-82, Abgent AP7644a, Abgent AP3068a, Aviva Systems Biology OAAB17159, Aviva Systems Biology OAAF00442, Aviva Systems Biology ARP30009_T100, Aviva Systems Biology ARP30010_P050, Cell Signaling Technology 3462S, Cell Signaling Technology 3464S, Cell Signaling Technology 3474S, Cell Signaling Technology 3466S, Cell Signaling Technology 3461S, Cell Signaling Technology 3461L, Cell Signaling Technology 3463S, Cell Signaling Technology 4577S, Fitzgerald Industries International 20R-2351, Fitzgerald Industries International 70R-12259, Fitzgerald Industries International 70R-17325. Коммерчески доступные антитела для PD-1 и PD-L1 доступны. См., например, biocompare.com/pfu/110447/soids/531283/Antibodies/PD1 (описаны коммерческие источники анти-PD-1 антител; последний доступ 3 июля 2019) и biocompare.com/pfu/110447/soids/592604/Antibodies/ PDL1 (описаны коммерческие источники анти-PD-1 антител; последний доступ 3 июля 2019). Специалист в данной области может обнаружить экспрессию FLT3, PD-1 и/или PD-L1, используя такие способы, как РНК-секвенирование, ДНК микроматрицы, ПЦР в реальном времени или иммунопреципитация хроматина (ChIP) и т. д. Экспрессию белка можно отслеживать с использованием таких способов, как проточная цитометрия, вестерн-блоттинг, 2-D гель-электрофорез, ELISA (иммуноферментный анализ) или другие иммуноанализы и т. д.

Эквиваленты антител. Настоящее описание представляет «эквиваленты» или «биологические эквиваленты» описанных выше антител, в которых антигенсвязывающий домен антитела является на, по меньшей мере, 80% или, альтернативно, 85% или, альтернативно, 90%, или Альтернативно, 95%, или, альтернативно, по меньшей мере, 97%, идентичным антигенсвязывающему домену любого из описанных выше антител, делая его биологическим эквивалентом описанных выше антител. Дополнительные примеры эквивалентов включают полипептид, который кодирован полинуклеотидом, который гибридизуется в условиях высокой жесткости с комплементом полинуклеотида, кодирующего последовательность нуклеиновой кислоты антигенсвязывающего домена любого из описанных выше антител, где условия высокой жесткости включают

температуры инкубации от примерно 55°C до примерно 68°C; концентрации буфера от примерно 1x SSC до примерно 0,1x SSC; концентрации формамида от примерно 55% до примерно 75%; и промывочные растворы примерно 1x SSC, 0,1x SSC или деионизированную воду.

Модификации антител. Антитела по настоящему изобретению могут быть мультимеризованы для увеличения аффинности к антигену. Антителом, которое должно быть мультимеризовано, может быть один тип антитела или множество антител, которые распознают множество эпитопов одного и того же антигена. В качестве примеров способа мультимеризации антитела можно привести связывание домена CH3 IgG с двумя молекулами scFv, связывание со стрептавидином, введение мотива спираль-поворот-спираль и подобные.

Композиции антитела, раскрытые в настоящем документе, могут быть в форме конъюгата, образованного между любым из этих антител и другим агентом (иммуноконъюгатом). В одном аспекте, антитело, раскрытое в настоящем документе, конъюгировано с радиоактивным материалом. В другом аспекте, антитело, раскрытое в настоящем документе, может быть связано с различными типами молекул, такими как полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Скриннинг антитела. Различные иммуноанализы могут применяться для скрининга для идентификации антител, обладающих желаемой специфичностью. В данной области хорошо известно множество протоколов конкурентного связывания или иммунорадиометрических анализов с использованием либо поликлональных, либо моноклональных антител с установленной специфичностью. Такие иммуноанализы обычно включают измерение образования комплекса между антигеном FLT3, PD-1 или PD-L1, или любым его фрагментом или олигопептидом, и его специфическим антителом. Может быть использован двухстадийный иммуноанализ на моноклональнальной основе с использованием моноклональных антител, специфичных к двум не интерферирующим FLT3, PD-1 или PD-L1 антигенным эпитопам, но также может быть использован анализ конкурентного связывания (Maddox et al. (1983) J. Exp. Med. 158:1211-1216).

Очистка антитела. Антитела, раскрытые в настоящем документе, могут быть очищены до гомогенности. Отделение и очистка антител может быть проведена с применением обычных способов разделения и очистки белков.

Только в качестве примера, антитело может быть отделено и очищено подходящим выбором и комбинированным использованием хроматографических колонок, фильтров, ультрафильтрации, осаждения солей, диализа, препаративного электрофореза в полиакриламидном геле, электрофореза с изоэлектрическим фокусированием и подобных. Стратегии очистки и характеризации белка: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988).

Примеры хроматографии включают аффинную хроматографию, ионообменную хроматографию, гидрофобную хроматографию, гель-фильтрационную хроматографию,

хроматографию с обращенной фазой и адсорбционную хроматографию. В одном аспекте, хроматографию можно проводить с использованием жидкостной хроматографии, такой как ВЭЖХ или ЖХБР.

В одном аспекте, колонку Protein A или колонку Protein G можно применять в аффинной хроматографии. Другие типовые колонки включают колонку Protein A, Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (Pharmacia) и подобные.

Выделенные нуклеиновые кислоты и способы получения CAR

Другие аспекты относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей или, альтернативно, состоящей по существу из или, дополнительно, состоящей из последовательности, содержащей или, альтернативно, состоящей по существу из, или, также дополнительно состоящей из, антигенсвязывающего домена FLT3 антитела; шарнирного домена; трансмембранного домена – например, CD28 трансмембранного домена; одной или нескольких костимулирующих областей – например, выбранных из CD28 костимулирующей сигнальной области, 4-1BB костимулирующей сигнальной области, ICOS костимулирующей сигнальной области и OX40 костимулирующей области; и CD3 дзета сигнального домена.

Не будучи связанными теорией, дополнительные аспекты рассматривают выделенную нуклеиновую кислоту, содержащую или, альтернативно, состоящую по существу из, или дополнительно состоящую из связывающего домена лиганда для экзогенной молекулы (*m.e.* не FLT3); шарнирного домена; трансмембранного домена – например, CD28 трансмембранного домена; одной или нескольких костимулирующих областей – например, выбранных из CD28 костимулирующей сигнальной области, 4-1BB костимулирующей сигнальной области, ICOS костимулирующей сигнальной области и OX40 костимулирующей области; и CD3 дзета сигнального домена. В других таких аспектах, связывающий домен лиганда для экзогенной молекулы распознает и связывает антигенсвязывающий домен FLT3 антитела, функционально связанный с экзогенной молекулой; тем самым создавая FLT3 CAR.

В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота дополнительно содержит или, альтернативно, состоит по существу из или также дополнительно состоит из полинуклеотидной последовательности, кодирующей последовательность нуклеиновой кислоты антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который необязательно распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1. В других вариантах осуществления, представлена вторая выделенная нуклеиновая кислота, содержащая или, альтернативно, состоящая по существу из или, также дополнительно состоящая из полинуклеотидной последовательности, кодирующей последовательность нуклеиновой кислоты антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который необязательно распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1. В любом из этих вариантов осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может содержать или, альтернативно, состоять по существу из или дополнительно состоять из PD-1 антагониста или агониста и/или PD-L1 антагониста или агониста. В определенных вариантах

осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит или, альтернативно, состоит по существу из или дополнительно состоит из релевантных CDR областей антитела к PD-1 и/или антитела PD-L1, или эквивалента каждой из них. В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит или, альтернативно, состоит по существу из или дополнительно состоит из переменной области тяжелой цепи и/или легкой цепи антитела к PD-1 и/или PD-L1, и/или эквивалента каждого из них. В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий антигенсвязывающий домен PD-1 антитела и/или одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий антигенсвязывающий домен PD-L1 антитела, и/или эквивалент каждого из них. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью:

Полинуклеотидная последовательность scFv анти-PD-1антитела:

CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGC
GTTAAAGTTTCTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGG
GTACGGCAGGCTCCAGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAA
CGGCGGCACTAACTTTAACGAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAACTGACT
CAAGTACGACTACAGCATACATGGAACTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTG
TCTATTATTGCGCGAGAAGAGACTATCGCTTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGC
AAGGTACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGGTGGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTCA
GGTGGAGGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCCCCAAGCTCTCTGTCCGCGTCA
GTGGGCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAGATGTGTCAACCGCTGTC
GCCTGGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCCTAAGCTTCTCATCTACTCAGCTTCT
TTTCTGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGGACGGACTTC
ACATTGACCATAAGTTCCTTGCAGCCTGAGGATTTCGCTACATATTATTGCCAACAG
TACCTTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG или ее эквивалент.

Аминокислотная последовательность scFv анти-PD-1 антитела:

QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGI
NPSNGGTNFNEKFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDY
WGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTA
VAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYL
YHPATFGQGTKVEIKR или ее эквивалент.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий антигенсвязывающий домен PD-L1 антитела. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью:

Полинуклеотидная последовательность scFv анти-PD-L1 антитела:

GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCAC
TCCGGTTGTCCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGT
GCGCCAAGCCCCGGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGG
GTTCCACCTACTATGCTGATTCAGTAAAAGGACGGTTCACTATAAGCGCGGATACAA
GTAAGAATACTGCCTATCTTCAAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTAT
ATTATTGCGCTAGACGACATTGGCCAGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTC
TTGTGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGGCAGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGT
GGTTCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCCACATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAG
AGAGCAACTCTGTCATGCCGGGCGTCAAAAGGTGTCAGTACGTCAGGCTACTCCTAT
CTTCATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCTTCTCATATACCTGGCT
AGTTACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGGTCTGGGACTGAT
TTTACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACTATTGCCAA
CATTCACGCGATTTGCCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTTGAAATAAAA или
ее эквивалент.

Аминокислотная последовательность scFv анти-PD-L1 антитела:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPY
GGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQG
TLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLH
WYQQKPGEAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDL
PLTFGGGTKVEIK или ее эквивалент.

В некоторых вариантах осуществления, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом является биспецифическое антитело. В определенных вариантах осуществления, биспецифическое антитело содержит или, альтернативно, состоит по существу из или дополнительно состоит из релевантных CDR областей антитела к PD-1 и/или антитела к PD-L1, или эквивалента каждой из них. В определенных вариантах осуществления, биспецифическое антитело содержит или, альтернативно, состоит по существу из или дополнительно состоит из релевантных CDR областей антитела PD-1 и/или антитела PD-L1, или эквивалента каждой из них. В некоторых вариантах осуществления, биспецифическое антитело содержит или, альтернативно, состоит по существу из или дополнительно состоит из переменной области тяжелой цепи и/или легкой цепи антитела к PD-1 и/или PD-L1, и/или эквивалента каждой из них. В некоторых вариантах осуществления, биспецифическое антитело содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий антигенсвязывающий домен PD-1 антитела и/или одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий антигенсвязывающий домен PD-L1 антитела, и/или эквивалент каждого из них.

В настоящем документе представлены выделенная нуклеиновая кислота или вектор, содержащий или, альтернативно, состоящий по существу из, или, также дополнительно состоящий из: полинуклеотида, кодирующего химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий или, альтернативно, состоящий по существу из, или, также дополнительно состоящий из: (a) антигенсвязывающего домена FLT3 антитела; (b)

шарнирного домена; (c) трансмембранного домена; (d) и внутриклеточного домена; и полинуклеотида, кодирующего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий или, альтернативно, состоящий по существу из, или, также дополнительно состоящий из антигенсвязывающего домена, который распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1.

Выделенная нуклеиновая кислота или вектор, раскрытый выше кодирующий CAR, может содержать, или, альтернативно, состоять по существу из, или также дополнительно состоять из любого CAR, раскрытого в настоящем документе. В одном аспекте, выделенная нуклеиновая кислота или вектор по настоящему описанию, кодирующие CAR, дополнительно содержит, или, альтернативно, состоит по существу из, или также дополнительно состоит из сигнального домена. В другом аспекте, выделенная нуклеиновая кислота или вектор по настоящему описанию, кодирующие CAR может дополнительно содержать или, альтернативно, состоять по существу из или дополнительно состоять из индуцируемого или конститутивно активного элемента. В одном варианте осуществления, индуцируемый или конститутивно активный элемент контролирует экспрессию полинуклеотида, кодирующего иммунорегуляторную молекулу или цитокин. Иммунорегуляторная молекула или цитокин может содержать, или, альтернативно, состоять по существу из, или также дополнительно состоять из одного или нескольких из B7.1, CCL19, CCL21, CD40L, CD137L, GITRL, GM-CSF, IL-12, IL-2, низкотоксичного IL-2, IL-15, IL-18, IL-21, LEC и/или OX40L. В другом аспекте, иммунорегуляторная молекула или цитокин может содержать, или, альтернативно, состоять по существу из, или также дополнительно состоять из IL-12 и/или GM-CSF; и/или IL-12 и/или одного или нескольких из IL-2 и низкотоксичного IL-2; и/или IL-12 и/или IL-15; и/или IL-12 и/или IL-21; IL-12 и/или B7.1; и/или IL-12 и/или OX40L; и/или IL-12 и/или CD40L; и/или IL-12 и/или GITRL; и/или IL-12 и/или IL-18; и/или одного или нескольких из IL-2 и низкотоксичного IL-2 и одного или нескольких из CCL19, CCL21 и LEC; и/или IL-15 и одного или нескольких из CCL19, CCL21 и LEC; и/или IL-21 и одного или нескольких из CCL19, CCL21 и LEC; и/или GM-CSF и одного или нескольких из CCL19, CCL21 и LEC; и/или OX40L и одного или нескольких из CCL19, CCL21 и LEC; и/или CD137L и одного или нескольких из CCL19, CCL21 и LEC; и/или содержит B7.1 и одного или нескольких из CCL19, CCL21 и LEC; и/или CD40L и одного или нескольких из CCL19, CCL21 и LEC; и/или GITRL и одного или нескольких из CCL19, CCL21 и LEC.

В одном варианте осуществления, шарнирный домен выделенной нуклеиновой кислоты вектора, кодирующего CAR, содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из CD8 α шарнирного домена. В другом аспекте, трансмембранный домен выделенной нуклеиновой кислоты или вектора, кодирующего CAR содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из CD8α трансмембранного домена. В отдельном аспекте, костимулирующая сигнальная область выделенной нуклеиновой кислоты или вектора, кодирующего CAR, содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из CD28

костимулирующей сигнальной области и/или 4-1BB костимулирующей сигнальной области.

В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота или вектор, кодирующий CAR, содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из: (a) антигенсвязывающего домена FLT3 антитела; (b) CD8 α шарнирного домена; (c) CD8 α трансмембранного домена; и (d) CD28 костимулирующей сигнальной области и/или 4-1BB костимулирующей сигнальной области. В других вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота или вектор, кодирующий CAR содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из: (a) антигенсвязывающего домена FLT3 антитела; (b) CD8 α шарнирного домена; (c) CD8 α трансмембранного домена; (d) CD28 костимулирующей сигнальной области и/или 4-1BB костимулирующей сигнальной области; и (e) CD3 дзета сигнального домена.

Для любой из выделенных нуклеиновых кислот или векторов, обсуждаемых выше, антигенсвязывающий домен FLT3 антитела выделенной нуклеиновой кислоты или вектора, кодирующего CAR, может содержать, или, альтернативно, состоять по существу из, или также дополнительно состоять из переменной области тяжелой цепи содержащий или, альтернативно, состоящий по существу из, или, также дополнительно состоящий из:

CDHR1, имеющей аминокислотную последовательность (SYWMH) или (NYGLH) или эквивалент каждой из них,

CDHR2, имеющей аминокислотную последовательность (EIDPSDSYKDYNQKFKD) или (VIWSGGSTDYNAAFIS) или эквивалент каждой из них, и

CDHR3 имеющей аминокислотную последовательность, кодируемую (AITTTPFDF) или (GGIYYANHYYAMDY) или эквивалент каждой из них, и/или переменной области легкой цепи, содержащей:

CDLR1, имеющей аминокислотную последовательность (RASQSISNNLH) или (KSSQSLLNSGNQKNYM) или эквивалент каждой из них,

CDLR2, имеющей аминокислотную последовательность (YASQSIS) или (GASTRES) или эквивалент каждой из них, и

CDLR3, имеющей аминокислотную последовательность (QQSNTWPYT) или (QNDHSYPLT) или эквивалент каждой из них.

Для любой из выделенных нуклеиновых кислот или вектора, обсуждаемых выше, антигенсвязывающий домен выделенной нуклеиновой кислоты или вектор, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1, может содержать или, альтернативно, состоять по существу из или дополнительно состоять из PD-1 антагониста и/или PD-L1 антагониста, и/или эквивалент каждого из них. В одном аспекте, антигенсвязывающий домен или антигенсвязывающий фрагмент, который распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1, содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из CDR областей антитела к PD-1 и/или PD-L1, и/или эквивалента каждой из них. В другом аспекте,

антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1, содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из переменной области тяжелой цепи и легкой цепи антитела к PD-1 и/или PD-L1, и/или эквивалента каждой из них. В дополнительном аспекте, антитело или антигенсвязывающ фрагмент, который распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1, содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), содержащего или, альтернативно, состоящего по существу из, или, также дополнительно состоящего из антигенсвязывающего домена PD-1 антитела, и/или одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), содержащего или, альтернативно, состоящего по существу из, или, также дополнительно состоящего из антигенсвязывающего домена PD-L1 антитела, и/или эквивалента каждого из них.

В одном варианте осуществления, антителом, которое распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1, является биспецифическое антитело. В другом варианте осуществления, его биспецифическое антитело содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из PD-1 антагониста и PD-L1 антагониста, и, необязательно, дополнительно содержит или, альтернативно, состоит по существу из или также дополнительно состоит из линкера. В другом варианте осуществления, его биспецифическое антитело содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из CDR областей антитела к PD-1 и PD-L1 и необязательно может дополнительно содержать, или, альтернативно, состоять по существу из или дополнительно состоять из линкера. В одном аспекте, биспецифическое антитело содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из переменной области тяжелой цепи и легкой цепи антитела к PD-1 и PD-L1 и, необязательно, может дополнительно содержать или, альтернативно, состоять по существу из, или дополнительно состоять из линкера. В другом варианте осуществления, биспецифическое антитело содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), содержащего или, альтернативно, состоящего по существу из, или, также дополнительно состоящего из антигенсвязывающего домена PD-1 антитела и одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv) содержащего или, альтернативно, состоящего по существу из, или, также дополнительно состоящего из антигенсвязывающего домена PD-L1 антитела и, необязательно, может дополнительно содержать или, альтернативно, состоять по существу из или дополнительно состоять из линкера.

В одном конкретном варианте осуществления, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) содержащий или, альтернативно, состоящий по существу из, или, также дополнительно состоящий из антигенсвязывающего домена PD-L1 антитела, содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из полинуклеотидной последовательности:
(GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCACTCCG
GTTGTCCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGTGCGC

CAAGCCCCGGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGGGTTC
CACCTACTATGCTGATTCAGTAAAAGGACGGTTCACTATAAGCGCGGATACAAGTA
AGAATACTGCCTATCTTCAAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTATATT
ATTGCGCTAGACGACATTGGCCAGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTTG
TGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGGCAGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGTGGT
TCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCCACATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAGAGA
GCAACTCTGTCATGCCGGGCGTCAAAAGGTGTCAGTACGTCAGGCTACTCCTATCTT
CATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCTTCTCATATACCTGGCTAGT
TACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGGTCTGGGACTGATTTT
ACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACTATTGCCAACAT
TCACGCGATTTGCCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTTGAAATAAAA) или ее эквивалента. В еще одном варианте осуществления, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) содержащий или, альтернативно, состоящий по существу из, или, также дополнительно состоящий из антигенсвязывающего домена PD-1 антитела, содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из полинуклеотидной последовательности:

(CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGCGTTA
AAGTTTCTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGGGTAC
GGCAGGCTCCAGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAACGGC
GGCACTAACTTTAACGAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAACTGACTCAAG
TACGACTACAGCATACATGGAACTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTGTCTA
TTATTGCGCGAGAAGAGACTATCGCTTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGCAAGG
TACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGGTGGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTCAGGTG
GAGGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCCCCAAGCTCTCTGTCCGCGTCAGTGG
GCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAGATGTGTCAACCGCTGTCGCCT
GGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCCTAAGCTTCTCATCTACTCAGCTTCTTTTC
TGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGGACGGACTTCACAT
TGACCATAAGTTCCTTGCAGCCTGAGGATTTCGCTACATATTATTGCCAACAGTACC
TTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG или ее эквивалента.

В одном аспекте, описанным здесь вектором является плазмида. В другом аспекте, вектором является вирусный вектор, выбранный из ретровирусного вектора, лентивирусного вектора, аденовирусного вектора или аденоассоциированного вирусного вектора. В другом аспекте, вектор является бицистронным.

Выделенная нуклеиновая кислота или вектор по настоящему описанию может дополнительно содержать или, альтернативно, состоять по существу из, или дополнительно состоять из промотора и/или энхансера, функционально связанного с полинуклеотидом, кодирующим антитело или антигенсвязывающ фрагмент, который распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1. В некоторых вариантах осуществления, промотором и/или энхансером, функционально связанным с полинуклеотидом,

кодирующим антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1, является промотор с высокой экспрессией. Неограничивающие примеры промоторов с высокой экспрессией включают цитомегаловирус (CMV), энхансер вируса миелопролиферативной саркомы (MND) и EF1 альфа промоторы.

В некоторых вариантах осуществления раскрыты способы получения клеток, экспрессирующих FLT3 CAR, где способ включает или, альтернативно, состоит по существу из или дополнительно состоит из трансдукции популяции выделенных клеток последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей FLT3 CAR, и последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент - необязательно, биспецифическое антитело - которое, необязательно, распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1, эквивалент каждого из них. В одном аспекте, способ получения клетки, экспрессирующей CAR, включает или, альтернативно, состоит по существу из или дополнительно состоит из трансдукции выделенной клетки выделенной нуклеиновой кислотой или вектором по настоящему описанию. Выделенные клетки могут быть выбраны из группы, состоящей из Т-клеток, В-клеток, NK-клеток, дендритных клеток, миелоидных клеток, моноцитов или макрофагов. В некоторых вариантах осуществления, это достигается за счет (i) использования вектора, кодирующего конструкт FLT3 CAR и антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или (ii) использования двух векторов, один из которых кодирует CAR FLT3, и другой кодирует антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления это достигается за счет использования иРНК, кодирующей конструкт FLT3 CAR и/или антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые, в свою очередь, могут быть введены в клетки посредством электропорации. См., например, Choi et al. (2010) Biomed Microdevices 12(5):855-863. В дополнительном аспекте, выбирают субпопуляцию клеток, которые были успешно трансдуцированы указанной последовательность нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления, выделенными клетками являются Т-клетки, Т-клетка животного, Т-клетка млекопитающего, Т-клетка кошки, Т-клетка собаки или Т-клетка человека, тем самым продуцируя Т-клетки FLT3 CAR. В определенных вариантах осуществления, выделенной клеткой является NK-клетка, например, NK-клетка животного, NK-клетка млекопитающего, NK-клетка кошки, NK-клетка собаки или NK-клетка человека, тем самым продуцируя NK-клетки FLT3 CAR. В некоторых вариантах осуществления, изолированными клетками являются В-клетки, В-клетка животного, В-клетка млекопитающего, В-клетка кошки, В-клетка собаки или В-клетка человека, тем самым продуцируя В-клетки FLT3 CAR.

Не будучи связанными теорией, дополнительные аспекты рассматривают способы трансдукции клетки выделенной нуклеиновой кислотой, содержащей или, альтернативно, состоящей по существу из, или, также дополнительно состоящей из а последовательности, содержащей или, альтернативно, состоящей по существу из, или, также дополнительно

состоящей из связывающего домена лиганда для экзогенной молекулы (*т.е.* не FLT3); шарнирного домена; трансмембранного домена – например, CD28 трансмембранного домена; одной или нескольких костимулирующих областей – например, выбранных из CD28 костимулирующей сигнальной области, 4-1BB костимулирующей сигнальной области, ICOS костимулирующей сигнальной области и OX40 костимулирующей области; и CD3 дзета сигнального домена, *т.е.* «универсальной CAR клеткой». В дополнительных таких аспектах, связывающий домен лиганда для экзогенной молекулы, который распознает экзогенную молекулу, которая функционально связана с антигенсвязывающим доменом FLT3антитела, функционально связанного; и, таким образом, FLT3 CAR создается при введении антигенсвязывающего домена FLT3 антитела, оперативно связанного с экзогенной молекулой. В некоторых вариантах осуществления, экзогенной молекулой является биотин или стрептавидин.

В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки, экспрессирующие раскрытые CAR, могут быть дополнительно модифицированы для снижения или устранения экспрессии эндогенных TCR. Уменьшение или устранение эндогенных TCR может снизить нецелевые эффекты и повысить эффективность Т-клеток. Т-клетки, в которых стабильно отсутствует экспрессия функционального TCR, могут быть получены с использованием различных подходов. Т-клетки интернализируют, сортируют и разрушают весь Т-клеточный рецептор как комплекс, с периодом полураспада примерно 10 часов в Т-клетках в состоянии покоя и 3 часа в стимулированных Т-клетках (von Essen, M. et al. (2004) J. Immunol. 173:384-393). Правильное функционирование комплекса TCR требует правильного стехиометрического соотношения белков, составляющих комплекс TCR. Функция TCR также требует наличия двух функционирующих дзета белков TCR с мотивами ITAM. Активация TCR при задействовании его MHC-пептидного лиганда требует вовлечения нескольких TCR в одну и ту же Т-клетку, все которые должны правильно передавать сигналы. Таким образом, если комплекс TCR дестабилизируется белками, которые не связываются должным образом или не могут оптимально подавать сигналы, Т-клетка не будет активирована в достаточной степени, чтобы начать клеточный ответ.

Следовательно, в некоторых вариантах осуществления, экспрессия TCR может быть устранена с использованием интерферирующей РНК (например, кшРНК, миРНК, микроРНК и т.д.), CRISPR или других способов, направленных на нуклеинов кислоты, кодирующие определенные TCR (например, TCR-α и TCR-β) и/или цепи CD3 в первичных Т-клетках. Блокируя экспрессию одного или нескольких из этих белков, Т-клетка больше не будет производить один или более ключевых компонентов комплекса TCR, тем самым дестабилизируя комплекс TCR и предотвращая поверхностную экспрессию функционального TCR. Несмотря на то, что некоторые комплексы TCR могут быть рециркулированы на поверхность клетки при использовании интерферирующих РНК, РНК (например, кшРНК, миРНК, микроРНК и т.д.) будет предотвращать новое производство белков TCR, что приводит к деградации и удалению всего комплекса TCR,

приводя к продукции Т-клетки, имеющей стойкий дефицит функциональной экспрессии TCR.

Экспрессия ингибирующих РНК (например, кшРНК, миРНК, микроРНК и т.д.) В первичных Т-клетках может быть достигнута с использованием любой традиционной системы экспрессии, например, лентивирусной системы экспрессии. Хотя лентивирусы полезны для направления на покоящиеся первичные Т-клетки, не все Т-клетки будут экспрессировать кшРНК. Некоторые из этих Т-клеток могут не экспрессировать достаточное количество РНК, чтобы позволить достаточное ингибирование экспрессии TCR для изменения функциональной активности Т-клетки. Таким образом, Т-клетки, которые сохраняют экспрессию TCR от умеренной до высокой после вирусной трансдукции, могут быть удалены, например, с помощью методов сортировки или разделения клеток, так что оставшиеся Т-клетки испытывают дефицит TCR или CD3 на клеточной поверхности, что делает возможным размножение изолированной популяции Т-клеток с дефицитом экспрессии функциональных TCR или CD3.

Экспрессия CRISPR в первичных Т-клетках может быть достигнута с использованием обычных систем CRISPR/Cas и направляющих РНК, специфичных для TCR-мишеней. Подходящие системы экспрессии, например лентивирусные или аденовирусные системы экспрессии, известны в данной области. Подобно доставке ингибирующих РНК, система CRISPR может быть использована для специфического направления на покоящиеся первичные Т-клетки или другие подходящие иммунные клетки для CAR клеточной терапии. Кроме того, в тех случаях, когда редактирование CRISPR является неудачным, клетки могут быть выбраны для успеха в соответствии с раскрытыми выше способами. Например, как отмечалось выше, Т-клетки, которые сохраняют экспрессию TCR от умеренной до высокой после вирусной трансдукции, могут быть удалены, например, с помощью методов сортировки или разделения клеток, так что оставшиеся Т-клетки будут иметь дефицит TCR или CD3 на клеточной поверхности, что делает возможным размножение выделенной популяции Т-клеток с дефицитом экспрессии функционального TCR или CD3. Кроме того, следует понимать, что редактирующий конструкт CRISPR может быть полезным как для выключения эндогенного TCR, так и для выключения конструктов CAR, раскрытых в настоящем документе. Следовательно, понятно, что система CRISPR может быть разработана для достижения одной или обеих этих целей.

Источники выделенных клеток. Перед размножением и генетической модификацией клеток, раскрытых в настоящем документе, клетки могут быть получены от субъекта - например, в вариантах осуществления, включающих аутологическую терапию - или коммерчески доступной клеточной культуры, например, American Type Culture Collection (ATCC).

Клетки могут быть получены из множества источников у субъекта, включающих мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, ткань тимуса, ткань из очага инфекции, асцит, плевральный

выпот, ткань селезенки и опухоли.

Способы выделения соответствующих клеток хорошо известны в данной области и могут быть легко адаптированы для настоящей заявки; типовой способ описан в примерах ниже. Способы изоляции для использования в связи с этим раскрытием включают, но не ограничены ими, систему Life Technologies Dynabeads®; STEMcell Technologies EasySep™, RoboSep™, RosetteSep™, SepMate™; Miltenyi Biotec MACS™ наборы для отделения клеток и другие коммерчески доступные наборы для отделения и выделения клеток. Конкретные субпопуляции иммунных клеток могут быть выделены через применением шариков или других связующих агентов, доступных в таких наборах, специфических к уникальным поверхностноклеточным маркерам. Например, MACS™ CD4+ и CD8+ MicroBeads могут применяться для выделения CD4+ и CD8+ Т-клеток.

Альтернативно, клетки могут быть получены через коммерчески доступные клеточные культуры, включая, но не ограничиваясь ими, для Т-клеток, линии BCL2 (AAA) Jurkat (ATCC® CRL-2902™), BCL2 (S70A) Jurkat (ATCC® CRL-2900™), BCL2 (S87A) Jurkat (ATCC® CRL-2901™), BCL2 Jurkat (ATCC® CRL-2899™), Neo Jurkat (ATCC® CRL-2898™); для В-клеток, линии AHH-1 (ATCC® CRL-8146™), BC-1 (ATCC® CRL-2230™), BC-2 (ATCC® CRL-2231™), BC-3 (ATCC® CRL-2277™), CA46 (ATCC® CRL-1648™), DG-75 [D.G.-75] (ATCC® CRL-2625™), DS-1 (ATCC® CRL-11102™), EB-3 [EB3] (ATCC® CCL-85™), Z-138 (ATCC #CRL-3001), DB (ATCC CRL-2289), Toledo (ATCC CRL-2631), Pfiffer (ATCC CRL-2632), SR (ATCC CRL-2262), JM-1 (ATCC CRL-10421), NFS-5 C-1 (ATCC CRL-1693); NFS-70 C10 (ATCC CRL-1694), NFS-25 C-3 (ATCC CRL-1695) и SUP-B15 (ATCC CRL-1929); и для NK-клеток, линии NK-92 (ATCC® CRL-2407™), NK-92MI (ATCC® CRL-2408™). Дополнительные примеры включают, но не ограничены ими, зрелые Т-клеточные линии, например, Deglis, EBT-8, HPB-MLp-W, HUT 78, HUT 102, Karpas 384, Ki 225, My-La, Se-Ax, SKW-3, SMZ-1 и T34; незрелые Т-клеточные линии, например, ALL-SIL, Be13, CCRF-CEM, CML-T1, DND-41, DU.528, EU-9, HD-Mar, HPB-ALL, H-SB2, HT-1, JK-T1, Jurkat, Karpas 45, KE-37, KOPT-K1, K-T1, L-KAW, Loucy, MAT, MOLT-1, MOLT 3, MOLT-4, MOLT 13, MOLT-16, MT-1, MT-ALL, P12/Ichikawa, Peer, PER0117, PER-255, PF-382, PFI-285, RPMI-8402, ST-4, SUP-T1 до T14, TALL-1, TALL-101, TALL-103/2, TALL-104, TALL-105, TALL-106, TALL-107, TALL-197, TK-6, TLBR-1, -2, -3 и -4, CCRF-HSB-2 (CCL-120.1), J.RT3-T3.5 (ATCC TIB-153), J45.01 (ATCC CRL-1990), J.CaM1.6 (ATCC CRL-2063), RS4;11 (ATCC CRL-1873), CCRF-CEM (ATCC CRM-CCL-119); Т-клеточные линии лимфомы кожи, например, HuT78 (ATCC CRM-TIB-161), MJ[G11] (ATCC CRL-8294), HuT102 (ATCC TIB-162); В-клеточные линии, полученные из анапластических и крупноклеточных лимфом, например, DEL, DL-40, FE-PD, JB6, Karpas 299, Ki-JK, Mac-2A Ply1, SR-786, SU-DHL-1, -2, -4,-5,-6,-7,-8,-9,-10 и -16, DOHH-2, NU-DHL-1, U-937, Granda 519, USC-DHL-1, RL; лимфом Ходжкина, например, DEV, HD-70, HDLM-2, HD-MyZ, HKB-1, KM-H2, L 428, L 540, L1236, SBH-1, SUP-HD1 и SU/RH-HD-l; и NK линии, такие как HANK1, KHYG-1, NKL, NK-YS, NOI-90 и YT. Клеточные линии лейкоза с нулевым фенотипом, включая, но не ограничиваясь ими, REH,

NALL-1, KM-3, L92-221, являются другим коммерчески доступным источником иммунных клеток, так же как и клеточные линии, полученные из других лейкозов и лимфом, такие как K562 эритролейкоз, THP-1 моноцитарный лейкоз, U937 лимфома, HEL эритролейкоз, HL60 лейкоз, HMC-1 лейкоз, KG-1 лейкоз, U266 миелома. Неограничивающие типовые источники для таких коммерчески доступных клеточных линий включают American Type Culture Collection или ATCC, (http://www.atcc.org/) и German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (https://www.dsmz.de/).

Векторы. CAR клетки могут быть получены с использованием векторов, содержащих полинуклеотиды, как описано выше. Таким образом, в настоящем описании представлен: (i) вектор, необязательно бицистронный вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты FLT3 CAR или ее комплемент или ее эквивалент, и, необязательно, дополнительно содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который необязательно распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1 эквивалент каждого из них или (ii) вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты FLT3 CAR или ее комплемент или ее эквивалент, и вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность нуклеиновых кислот антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которая необязательно распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1 эквивалент каждого из них. В определенных вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из PD-1 антагониста или агониста и/или PD-L1 антагониста или агониста, или эквивалента каждого из них. В определенных вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит или, альтернативно, состоит по существу из или дополнительно состоит из релевантных CDR областей антитела к PD-1 и/или антитела PD-L1, или эквивалента каждого из них. В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит или, альтернативно, состоит по существую из или дополнительно состоит из переменной области тяжелой цепи и/или легкой цепи антитела, которое распознает и связывается с PD-1 и/или PD-L1, и/или эквивалента каждого из них. В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит или, альтернативно, состоит по существу из или дополнительно состоит из одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), содержащего антигенсвязывающий домен PD-1 антитела, и/или одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), содержащего антигенсвязывающий домен PD-L1 антитела, и/или эквивалент каждого из них. В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из, одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), содержащего антигенсвязывающий домен PD-1 антитела, который содержит аминокислотную

последовательность, кодируемую:

Анти-PD-1 scFv:

CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGC
GTTAAAGTTTCTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGG
GTACGGCAGGCTCCAGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAA
CGGCGGCACTAACTTTAACGAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAACTGACT
CAAGTACGACTACAGCATACATGGAACTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTG
TCTATTATTGCGCGAGAAGAGACTATCGCTTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGC
AAGGTACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGGTGGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTCA
GGTGGAGGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCCCCAAGCTCTCTGTCCGCGTCA
GTGGGCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAGATGTGTCAACCGCTGTC
GCCTGGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCCTAAGCTTCTCATCTACTCAGCTTCT
TTTCTGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGGACGGACTTC
ACATTGACCATAAGTTCCTTGCAGCCTGAGGATTTCGCTACATATTATTGCCAACAG
TACCTTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG или
ее эквивалентом.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), полученного из антитела к PD-L1, которое содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из аминокислотной последовательности, кодированной полинуклеотидной последовательностью:

Анти-PD-L1scFv:

GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCAC
TCCGGTTGTCCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGT
GCGCCAAGCCCCGGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGG
GTTCCACCTACTATGCTGATTCAGTAAAAGGACGGTTCACTATAAGCGCGGATACAA
GTAAGAATACTGCCTATCTTCAAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTAT
ATTATTGCGCTAGACGACATTGGCCAGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTC
TTGTGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGGCAGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGT
GGTTCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCCACATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAG
AGAGCAACTCTGTCATGCCGGGCGTCAAAAGGTGTCAGTACGTCAGGCTACTCCTAT
CTTCATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCTTCTCATATACCTGGCT
AGTTACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGGTCTGGGACTGAT
TTTACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACTATTGCCAA
CATTCACGCGATTTGCCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTTGAAATAAAA или
ее эквивалентом.

В некоторых вариантах осуществления, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом является биспецифическое антитело. В некоторых вариантах осуществления, биспецифическое антитело содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или

дополнительно состоит из PD-1 антагониста или агониста и/или PD-L1 антагониста или агониста. В определенных вариантах осуществления, биспецифическое антитело содержит или, альтернативно, состоит по существу из или дополнительно состоит из релевантных CDR областей антитела, которое распознает и связывается с PD-1 и/или антитела к PD-L1, или эквивалентов каждого из них. В некоторых вариантах осуществления, биспецифическое антитело содержит или, альтернативно, состоит по существу из или дополнительно состоит из переменной области тяжелой цепи и/или легкой цепи антитела к PD-1 и/или PD-L1, и/или эквивалента каждой из них. В некоторых вариантах осуществления, биспецифическое антитело содержит или, альтернативно, состоит по существу из или дополнительно состоит из одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), содержащего антигенсвязывающий домен PD-1 антитела, и/или одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), содержащего антигенсвязывающий домен PD-L1 антитела, и/или эквивалент каждого из них. В некоторых вариантах осуществления, биспецифическое антитело содержит или, альтернативно, состоит по существу из или дополнительно состоит из одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), содержащего антигенсвязывающий домен PD-1 антитела, содержащий анти-PD-1scFv аминокислотную последовательность, представленную в настоящем документе выше. В некоторых вариантах осуществления, биспецифическое антитело содержит или, альтернативно, состоит по существу из или дополнительно состоит из одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), полученного из антитела к PD-L1, которое содержит или, альтернативно, состоит по существу из или дополнительно состоит из анти-PD-L1scFv аминокислотной последовательности, представленной в настоящем документе выше.

В любом из представленных выше вариантов осуществления, вектор или векторы могут необязательно содержать или, альтернативно, состоять по существу из или дополнительно состоять из определяемой метки и/или полинуклеотида, придающего резистентность к антибиотикам и/или регуляторных элементов для транскрипции и трансляции для CAR и антигенсвязывающего домена, который распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1.

В любом из представленных выше вариантов осуществления, каждый из полинуклеотидов может быть функционально связан с регуляторным полинуклеотидом, необязательно промотором и/или энхансером. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее антигенсвязывающий домен, который распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1, функционально связан с промотором и/или энхансером, который позволяет сверхэкспрессию антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления, выделенная последовательность нуклеиновой кислоты FLT3 CAR кодирует CAR, содержащий или, альтернативно, состоящий по существу из, или, также дополнительно состоящий из антигенсвязывающего домена FLT3 антитела, шарнирного домена, CD28 трансмембранного домена или одной или нескольких костимулирующих областей,

выбранных из CD28 костимулирующей сигнальной области, 4-1BB костимулирующей сигнальной области, ICOS костимулирующей сигнальной области и OX40 костимулирующей области и CD3 дзета сигнального домена. В одном аспекте, антигенсвязывающий домен имеет аффинность связывания с FLT3, которая, по меньшей мере, примерно в 10^6, 10^7, 10^8 или 10^9 раз больше, чем его аффинность связывания для молекулы, не родственной FLT3. В конкретных вариантах осуществления, выделенная последовательность нуклеиновой кислоты содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно, состоит из последовательностей, кодирующих (a) антигенсвязывающий домен FLT3 антитела, за которым следует (b) шарнирный домен, (c) CD28 трансмембранный домен, за которым следует (d) одна или несколько костимулирующих областей, выбранных из CD28 костимулирующей сигнальной области, 4-1BB костимулирующей сигнальной области, ICOS костимулирующей сигнальной области и OX40 костимулирующей области, за которой следует (e) CD3 дзета сигнальный домен.

В определенных вариантах осуществления, выделенная последовательность нуклеиновой кислоты дополнительно содержит, или дополнительно состоит по существу из или дополнительно состоит из полинуклеотидной промоторной последовательности, расположенной выше полинуклеотида, кодирующего антигенсвязывающий домен FLT3 антигенсвязывающего домена FLT3 антитела. В некоторых вариантах осуществления, этим промотором является цитомегаловирусная (CMV) промоторная последовательность, промотор энхансера вируса миелопролиферативной саркомы (MND) или EF1 альфа промотор. Неограничивающие типовые последовательности указанных промоторов представлены в настоящем документе.

Последовательность промотора CMV:

TAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGT
TACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATT
GACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACG
TCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCA
TATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTA
TGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTC
ATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGG
TTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTT
GGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACG
CAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGT
GAACCGTCAG и необязательно, ее эквивалент.

Последовательность промотора CMV:

GCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTTTATATAAGCAGAGCTCGT
TTAGTGAACCGTCAGATC и необязательно, ее эквивалент.

Последовательность промотора MND:

AACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGA

GCTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCC
ACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGACTCTAGAGGATC и необязательно, ее эквивалент.

Последовательность промотора EF1 альфа:

AAGGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCC
ACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACGGGTGCCTAGAGAA
GGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCG
AGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCA
ACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGCTGAAGCTTCGAGGGGCTCGCATCTCTCCTTCAC
GCGCCCGCCGCCCTACCTGAGGCCGCCATCCACGCCGGTTGAGTCGCGTTCTGCCGC
CTCCCGCCTGTGGTGCCTCCTGAACTGCGTCCGCCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCA
GGTCGAGACCGGGCCTTTGTCCGGCGCTCCCTTGGAGCCTACCTAGACTCAGCCGGC
TCTCCACGCTTTGCCTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACGTCTTTGTTTCGTTTTCTGTT
CTGCGCCGTTACAGATCCAAGCTGTGACCGGCGCCTAC и необязательно, ее эквивалент.

В определенных вариантах осуществления, выделенная последовательность нуклеиновой кислоты дополнительно содержит, или дополнительно состоит по существу из, или дополнительно состоит из индуцируемой каспазы («iCasp») или другого «гена самоубийства», кодирующего полинуклеотидные последовательности, расположенные выше полинуклеотида, кодирующего антигенсвязывающий домен FLT3 антигенсвязывающего FLT3 домена антитела; неограничивающая иллюстративная полинуклеотидная последовательность указанного гена iCasp представлена в настоящем документе:

Последовательность iCasp:

ATGGGAGTGCAGGTGGAAACCATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCCA
AGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGCACTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAAGAAA
GTTGATTCCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGA
GGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCCAGATGAGTGTGGGTCAGAGAGCCA
AACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCC
CACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAAACTGGAATCTGGCGGTG
GATCCGGAGTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAAT
GCAGATTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAAC
AATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGAC
TGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAGGGC
GACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCAGCAGGACCA
CGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCA
CCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTCGGTCGAGAA
GATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGC
TCTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCT
CCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGT

TCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCACAC
CCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCC
CAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCA
CTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG
GATTTATA и необязательно, ее эквивалент.

В некоторых вариантах осуществления, конструкт iCasp гена содержит часть каспазы 9, функционально связанную с доменом FKBP белка. Каспаза9, кодированная CASP9 геном (Номер доступа GenBank. NM001229), является неограничивающим примером инициатора каспазы и играет роль в митохондриальном апоптозном пути; ее часть присутствует в не ограничивающей типовой последовательности, описанной ниже. Домен FKBP белка в раскрытой выше неограничивающей типовой последовательности оптимизирован так, чтобы связывать индуцирующий агент, более конкретно, химический индуктор димеризации (CID). В раскрытой выше последовательности, химическим индуктором является AP1903, синтетический препарат, который оказался безопасным для здоровых добровольцев. Предполагается, что эквиваленты как домена FKBP, так и химического индуктора димеризации (например, модифицированные формы AP1903 или FKBP) могут использоваться вместо перечисленных примерных вариантов осуществления. В некоторых аспектах, димеризация может быть вызвана любой небольшой молекулой, которая, как известно, способствует димеризации каспазы 9. Введение этой небольшой молекулы приводит к перекрестному связыванию и активации каспазы 9, что, в свою очередь, вызывает апоптоз клеток, экспрессирующих ген iCasp.

Аминокислотная последовательность iCasp:

MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGK
QEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLESGGG
SGVDGFGDVGALESLRGNADLAYILSMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKL
RRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPG
AVYGTDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESP
GSNPEPDATPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDD
IFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIY и необязательно, ее эквивалент.

В определенных вариантах осуществления, выделенная последовательная нуклеиновая кислота дополнительно содержит, или дополнительно состоит по существу из, или еще дополнительно состоит из пептида 2A (T2A), кодирующего полинуклеотидную последовательность, расположенную выше полинуклеотида, кодирующего антигенсвязывающий домен FLT3 антигенсвязывающего домена FLT3 антитела; кодирование неограничивающей типовой последовательности указанного T2A полинуклеотида представлена в настоящем документе:

Последовательность T2A:

GCCGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCC
GGCCCT и необязательно, ее эквивалент.

Аминокислотная последовательность T2A:

AEGRGSLLTCGDVEENPGP и необязательно ее эквивалент.

В вариантах, включающих T2A, T2A-медиированное «самоотщепление» может быть вызвано 1:1 соотношением двух отдельных белков.

В определенных вариантах осуществления, выделенная последовательность нуклеиновой кислоты дополнительно содержит, дополнительно состоит по существу из или еще дополнительно состоит из сигнального пептида, кодирующего полинуклеотидные последовательности, расположенные выше полинуклеотида, кодирующего антигенсвязывающий домен FLT3 антигенсвязывающего домена FLT3 антитела; полинуклеотиды, кодирующие неограничивающие типовые последовательности указанных сигнальных пептидов, представлены в настоящем документе.

Последовательность сигнального пептида, кодирующего полинуклеотидную последовательность:

ATGGGATGGAGCTCTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCA C и необязательно, ее эквивалент.

Аминокислотная последовательность сигнального пептида:

MGWSSIILFLVATATGVH и необязательно ее эквивалент.

Последовательность сигнального пептида:

MGWSCIILFLVATATGVHS и необязательно, ее эквивалент.

Последовательность сигнального пептида:

MDWIWRILFLVGAATGAHS и необязательно, ее эквивалент.

В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота содержат определяемую метку и/или полинуклеотид, придающий резистентность к антибиотикам. В одном из аспектов метка или полинуклеотид полезны для отбора клеток, успешно трансдуцированных выделенными нуклеиновыми кислотами. В определенных вариантах осуществления, такой определяемой меткой является белковая метка, полученная из гена c-myc, известная как «myc tag». Неограничивающий пример последовательности, кодирующей указанный myc tag, раскрыта ниже.

«myc» последовательность:

GAGCAGAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTG и необязательно, ее эквивалент.

«myc» аминокислотная последовательность:

EQKLISEEDL и необязательно, ее эквивалент.

В некоторых вариантах осуществления, выделенная последовательность нуклеиновой кислоты заключена в вектор. В определенных вариантах осуществления, вектором является плазмида. В других вариантах осуществления, вектором является вирусный вектор. Неограничивающие примеры включают, без ограничения, ретровирусный вектор, лентивирусный вектор, аденовирусный вектор и аденоассоциированный вирусный вектор. В конкретных вариантах осуществления, вектором является лентивирусный вектор.

Получение типовых векторов и создание клеток, экспрессирующих CAR, с использованием указанных векторов подробно обсуждается в приведенных ниже

примерах. Коротко, экспрессия природных или синтетических нуклеиновых кислот, кодирующих CAR или иммунорегуляторные молекулы, обычно достигается за счет функционального связывания нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид CAR или его части, с промотором, и введения конструкта в вектор экспрессии. Аналогичный способ можно использовать для создания выделенной последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей полинуклеотид, кодирующий иммунорегуляторную молекулу. Векторы могут быть подходящими для репликации и интеграции эукариотов. Способы получения клеток, содержащих вектор и/или экзогенные нуклеиновые кислоты хорошо известны в данной области техники. См., например, Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York).

В одном из аспектов термин «вектор» означает рекомбинантный вектор, который сохраняет способность инфицировать и трансдуцировать неделящиеся и/или медленно делящиеся клетки и интегрировать в геном клетки-мишени. В некоторых аспектах, вектор получен или основан на вирусе дикого типа. В дополнительных аспектах, вектор получен основан на лентивирусе дикого типа. Их примеры включают, без ограничения, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус инфекционной анемии лошадей (EIAV), вирус иммунодефицита обезьян (SIV) и вирус иммунодефицита кошек (FIV). Альтернативно, предполагается, что другой ретровирус может быть использован в качестве основы для скелета вектора, такого как вирус лейкемии мышей (MLV). Будет очевидно, что вирусный вектор согласно раскрытию не обязательно должен ограничиваться компонентами конкретного вируса. Вирусный вектор может содержать компоненты, полученные из двух или более разных вирусов, и также может включать синтетические компоненты. Компонентами вектора можно манипулировать для получения желаемых характеристик; таких как специфичность клетки-мишени.

Рекомбинантные векторы по настоящему описанию получают от приматов и не приматов. Примеры лентивирусов приматов включают вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), возбудитель синдрома приобретенного иммунодефицита человека (СПИД) и вирус иммунодефицита обезьян (SIV). Группа лентивирусов не приматов включает прототип «медленного вируса» вируса висна/маеди (VMV), а также связанный с ним вирус артрита-энцефалита коз (CAEV), вирус инфекционной анемии лошадей (EIAV) и недавно описанный вирус иммунодефицита кошек (FIV) и вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV). Рекомбинантные лентивирусные векторы известного уровня техники известны в данной области техники, например, см. патенты США №№ 6,924,123; 7,056,699; 7,419,829 и 7,442,551, включенные в настоящий документ в качестве ссылки.

В патенте США № 6924123 раскрыто, что определенные ретровирусные последовательности облегчают интеграцию в геном клетки-мишени. Этот патент учит, что каждый ретровирусный геном включает гены, называемые gag, pol и env, которые кодируют вирионные белки и ферменты. Эти гены с обоих концов фланкированы областями, называемыми длинными концевыми повторами (LTR). LTR отвечают за провирусную интеграцию и транскрипцию. Они также служат в качестве энхансерных-

промоторных последовательностей. Другими словами, LTR могут контролировать экспрессию вирусных генов. Инкапсулирование ретровирусных РНК происходит благодаря пси-последовательности, расположенной на 5'-конце вирусного генома. Сами LTR являются идентичными последовательностями, которые можно разделить на три элемента, которые называются U3, R и U5. U3 получают от последовательностей, уникальных для 3'-конца РНК. R получают из последовательности, повторяющейся на обоих концах РНК, и U5 получают из последовательности, уникальной для 5'-конца РНК. Размеры этих трех элементов могут значительно различаться у разных ретровирусов. Для вирусного генома, сайт поли (A) добавления (окончания) находится на границе между R и U5 в правой части LTR. U3 содержит большинство транскрипционных контрольных элементов провируса, которые включают промотор и множественные энхансерные последовательности, реагирующие на клеточные и в некоторых случаях вирусные белки-активаторы транскрипции.

Что касается самих структурных генов gag, pol и env, то gag кодирует внутренний структурный белок вируса. Белок gag протеолитически процессируется в зрелые белки MA (матрица), CA (капсида) и NC (нуклеокапсида). Ген pol кодирует обратную транскриптазу (RT), которая содержит ДНК-полимеразу, ассоциированную РНКазу H и интегразу (IN), которые опосредуют репликацию генома.

Для продуцирования частиц вирусного вектора, вектор РНК генома экспрессируется из кодирующего его конструкта ДНК в клетке-хозяине. Компоненты частиц, не кодированных векторным геномом, представлены транс-активной дополнительной последовательностью нуклеиновых кислот («системой упаковки», которая обычно включает один или оба гена gag/pol и env), экспрессированных в клетке-хозяине. Набор последовательностей, необходимых для продуцирования частиц вирусного вектора, может быть введен в клетку-хозяин посредством временной трансфекции, или он может быть интегрирован в геном клетки-хозяина, или он может быть предоставлен смешанными путями. Используемые методы известны специалистам в данной области.

Ретровирусные векторы для применения в настоящем описании включают, но не ограничены ими, серию Invitrogen's pLenti, версии 4, 6 и 6.2 системы «ViraPower» производства Lentigen Corp.; pHIV-7-GFP, созданный в лаборатории и использованный в City of Hope Research Institute; «Lenti-X» лентивирусный вектор, pLVX, производства Clontech; pLKO.1-puro, производства Sigma-Aldrich; pLemiR, производства Open Biosystems; и pLV, созданый в лаборатории и использованный в Charité Medical School, Institute of Virology (CBF), Berlin, Germany.

Другие способы введения экзогенных нуклеиновых кислот в данной области известны и включают, но не ограничиваются ими, доставку генов с использованием одного или нескольких из РНК электропорации, нанотехнологии, векторов «спящая красавица», ретровирусов и/или аденовирусов. Кроме того,

Независимо от способа, используемого для введения экзогенных нуклеиновых

кислот в клетку-хозяин или иного воздействия на клетку ингибитора по настоящему раскрытию, для подтверждения присутствия последовательности рекомбинантных ДНК в клетке-хозяине могут быть выполнены различные анализы. Такие анализы включают, например, «молекулярно-биологические» анализы, хорошо известные специалистам в данной области, такие как Саузерн- и Нозерн-блоттинг, РВ-ПЦР и ПЦР; «биохимические» анализы, такие как определение присутствия или отсутствия конкретного пептида, например, иммунологическими средствами (ELISA и вестерн-блоттинг) или анализами, описанными в настоящем документе, для идентификации агентов, попадающих в объем настоящего раскрытия.

Упаковочный вектор и клеточные линии. Выделенные нуклеиновые кислоты могут быть упакованы в ретровирусную упаковочную систему с использованием упаковочного вектора и клеточных линий. Упаковочный вектор включает, но не ограничивается этим, ретровирусный вектор, лентивирусный вектор, аденовирусный вектор и аденоассоциированный вирусный вектор. Упаковочный вектор содержит элементы и последовательности, которые облегчают доставку генетического материала в клетки. Например, ретровирусными конструктами являются упаковывающие векторы, содержащие по меньшей мере одну ретровирусную хелперную ДНК последовательность, полученную из ретровирусного генома с дефектом по репликации, кодирующего все транс-активные белки вириона, необходимые для упаковки ретровирусного вектора с дефектом по репликации, и для продуцирования вирионных белков, способных упаковывать ретровирусный вектор с дефектом по репликации с высоким титром, без продуцирования репликационно-компетентного хелперного вируса. Ретровирусная ДНК последовательности не имеет область, кодирующую нативный энхансер и/или промотор вирусного 5'-LTR вируса, и не имеет как пси-функциональную последовательность, отвечающую за упаковку хелперного генома, так и 3'-LTR, но кодирует чужеродный сайт полиаденилирования, например сайт полиаденилирования SV40 и чужеродный энхансер и/или промотор, который направляет эффективную транскрипцию в типе клеток, где желательно продуцирование вируса. Ретровирусом является вирус лейкоза, такой как вирус мышиного лейкоза Молони (MMLV), вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) или вирус лейкоза гиббонов (GALV). Чужеродным энхансером и промотором может быть предранний (IE) энхансер и промотор цитомегаловируса человека (HCMV), энхансер и промотор (область U3) вируса мышиной саркомы Молони (MMSV), область U3 вируса саркомы Рауса (RSV), область U3 вируса некроза селезенки (SFFV) или энхансер IE HCMV, соединенный с промотором нативного вируса мышиного лейкоза Молони (MMLV). Ретровирусный упаковочный вектор может состоять из двух ретровирусных хелперных ДНК последовательностей, кодированных векторами экспрессии на основе плазмиды, например, где первая хелперная последовательность содержит кДНК, кодирующую белки gag и pol экотропного MMLV или GALV, и вторая хелперная последовательность содержит кДНК, кодирующую белок env. Ген Env, который определяет диапазон хозяев, может быть получен из генов, кодирующих ксенотропные,

амфотропные, экотропные, политропные (формирующие фокусы в культуре клеток норки) или 10A1 env белки вируса лейкоза мышей, или вируса лейкоза гиббонов (env белок GALV, env белок (gp160) вируса иммунодефицита человека, G белок вируса везикулярного стоматита (VSV), env генные продукты Т-клеточного лейкоза человека (HTLV) I и II типа, ген химерной оболочки, полученный из комбинаций одного или нескольких из вышеупомянутых env генов, или гены химерной оболочки, кодирующие цитоплазматические и трансмембранные вышеупомянутые продукты env гена и моноклональные антитела, направленные против специфической поверхностной молекулы на желаемой клетке-мишени.

В процессе упаковки, упаковывающие векторы и ретровирусные векторы временно котрансфицируются в первую популяцию клеток млекопитающих, которые способны продуцировать вирус, таких как клетки почки эмбриона человека, например клетки 293 (ATCC No. CRL1573, ATCC, Rockville, MD.) для получения супернатантов, содержащих рекомбинантный ретровирус с высоким титром. В другом способе настоящего описания, эту временно трансфицированную первую популяцию клеток затем культивируют совместно с клетками-мишенями млекопитающих, например лимфоцитами человека, для трансдукции клеток-мишеней с чужеродным геном с высокой эффективностью. В еще одном способе по настоящему раскрытию, супернатанты описанной выше временно трансфицированной первой популяции клеток инкубируют с клетками-мишенями млекопитающих, например лимфоцитами человека или гемопоэтическими стволовыми клетками, для трансдукции клеток-мишеней с помощью чужеродного гена с высокой эффективностью.

В другом аспекте, упаковывающие векторы стабильно экспрессируются в первой популяции клеток млекопитающих, способных продуцировать вирус, таких как клетки почки эмбриона человека, например клетки 293. Ретровирусные или лентивирусные векторы вводят в клетки либо путем котрансфекции с выбранным маркером, либо путем инфицирования псевдотипированным вирусом. В обоих случаях, векторы объединяются. Альтернативно векторы могут быть введены в эписомально поддерживаемую плазмиду. Получают супернатанты, содержащие рекомбинантный ретровирус с высоким титром.

В одном конкретном варианте осуществления, В настоящем документе представлен выделенный полинуклеотид или вектор, содержащий элементы, указанные на **ФИГ. 1,** и эквиваленты каждого из раскрытых элементов. На **ФИГ. 1** описан бицистронный FLT3 CAR с секреторными PD-1-PD-L1 биспецифическими антителами. FLT3 CAR управляется EF1α промотором. PD-1-PD-L1 biAb связан с CAR через T2A и управляется секреторным сигнальным пептидом (SS). Выделенный полинуклеотид может быть вставлен в вектор, такой как лентивирусный вектор, который фланкирован длинными концевыми повторами.

FLT3-специфические CAR клетки

Аспекты настоящего раскрытия относятся к выделенной клетке, содержащей выделенные полинуклеотиды и/или векторы, как описано в настоящем документе, где

клетка экспрессирует полинуклеотид. В одном аспекте, FLT3 CAR получают экспрессией выделенных полинуклеотидов, как раскрыто в настоящем документе, в клетке-хозяине, которая также экспрессирует или содержит PD-1 и/или PD-L1 специфическую антигенсвязывающую область. Клеткой является прокариотическая или эукариотическая клетка. В определенных вариантах осуществления, выделенной клеткой является Т-клетка, например, Т-клетка животного, Т-клетка млекопитающего, Т-клетка кошки, Т-клетка собаки или Т-клетка человека. В некоторых вариантах осуществления, выделенной клеткой является NK-клетка, например, NK-клетка животного, NK-клетка млекопитающего, NK-клетка кошки, NK-клетка собаки или NK-клетка человека. Эукариотическая клетка может происходить из любого предпочтительного вида, например, из клетки животного, клетки млекопитающего, такой как клетка человека, кошки или собаки. В других вариантах осуществления, эукариотической клеткой является иммунная клетка, необязательно, Т-клетка, В-клетка, NK-клетка, дендритная клетка, миелоидная клетка, моноцит или макрофаг. Клетки применяют терапевтически и диагностически. В одном аспекте, выделенная клетка по настоящему описанию экспрессирует CAR и секретирует антитело, необязательно биспецифическое антитело.

В конкретных вариантах осуществления, выделенная клетка содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из экзогенного CAR, содержащего или, альтернативно, состоящего по существу из, или, также дополнительно состоящего из антигенсвязывающего домена FLT3 антитела; шарнирного домена; трансмембранного домена – например, CD28 трансмембранного домена; и, необязательно, одной или нескольких костимулирующих областей – например, выбранных из CD28 костимулирующей сигнальной области, 4-1BB костимулирующей сигнальной области, ICOS костимулирующей сигнальной области и OX40 костимулирующей области; и CD3 дзета сигнального домена и антигенсвязывающего домена, который распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1. В дополнительном аспекте, клетка была активирована, как описано ниже.

Дополнительно в настоящем документе представлены популяции выделенных клеток по настоящему описанию. Также представлена популяция клеток, которые активированы и размножены из клетки, описанной выше. Популяция может быть по существу гомогенной, имеющей клетки, которые на, по меньшей мере, 50%, или, альтернативно, по меньшей мере, 60%, или, альтернативно, по меньшей мере, 70%, или, альтернативно, по меньшей мере, 75%, или, альтернативно, по меньшей мере, 80%, или, альтернативно, по меньшей мере, 85%, или, альтернативно, по меньшей мере, 90%, или, альтернативно, по меньшей мере, 95%, или, альтернативно, по меньшей мере, 98%, идентичны.

Активация и размножение CAR клеток. Независимо от того, до или после генетической модификации клеток для экспрессии желательного CAR, клетки могут быть активированы и размножены с использованием общеизвестных способов, таких как описаны в патентах США №№ 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358;

6,887,466; 6,905,681; 7, 144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041 и ссылках, таких как Lapateva et al. (2014) Crit Rev Oncog 19(1-2):121-132; Tam et al. (2003) Cytotherapy 5(3):259-272; Garcia-Marquez et al. (2014) Cytotherapy 16(11):1537-1544. Стимуляция FLT3, PD-1 или PD-L1 антигеном ex vivo может активировать и размножать выбранную субпопуляцию клеток, экспрессирующие CAR. Альтернативно, клетки могут быть активированы in vivo взаимодействием с FLT3, PD-1 или PD-L1 антигеном.

В случае определенных иммунных клеток для активации и размножения клеток могут потребоваться дополнительные популяции клеток, растворимые лиганды и/или цитокины или стимулирующие агенты. Соответствующие реагенты хорошо известны в данной области и выбираются в соответствии с известными иммунологическими принципами. Например, растворимый лиганд CD-40 может быть полезен для активации и увеличения определенных популяций B-клеток; аналогично облученные питающие клетки можно использовать в процедуре активации и размножения NK-клеток.

Соответствующие реагенты хорошо известны в данной области и выбираются в соответствии с известными иммунологическими принципами. Например, растворимый лиганд CD-40 может быть полезен для активации и размножения определенных популяций B-клеток; аналогично, облученные питающие клетки можно использовать в процедуре активации и размножения NK-клеток.

Способы активации соответствующих клеток хорошо известны в данной области и могут быть легко адаптированы к настоящему применению; типовой способ описан в примерах ниже. Способы выделения для использования в связи с этим раскрытием включают, но не ограничиваются ими наборы для системы активации и размножения Life Technologies Dynabeads®; наборы для активации BD Biosciences Phosflow™, наборы для активации/размножения Miltenyi Biotec MACS™ и другие коммерчески доступные клеточные наборы, специфические для активации группы соответствующих клеток. Конкретные субпопуляции иммунных клеток могут быть активированы или размножены через применение шариков или других агентов, доступных в таких наборах. Например, α-CD3/α-CD28 Dynabeads® могут применяться для активации и размножения популяции выделенных T-клеток.

Дополнительно в настоящем описании описан выделенный комплекс, содержащий или, альтернативно, состоящий по существу из, или, также дополнительно состоящий из выделенной клетки по настоящему описанию, связанной с клеткой, экспрессирующей FLT3 и/или PD-1 и/или PD-L1 и/или его фрагмент. В другом аспекте, выделенный комплекс содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из выделенной клетки по настоящему описанию, связанной с FLT3 и/или PD-1 и/или PD-L1 и/или его фрагментом.

Композиции и носители

Дополнительные аспекты раскрытия относятся к композициям, содержащим или альтернативно, состоящим по существу, или также состоящим из носителя и одного или

нескольких продуктов - например, FLT3 CAR, выделенной клетки, содержащей FLT3 CAR и области связывания антигена PD-1 и/или PD-L1, популяции клеток, выделенной нуклеиновой кислоты, вектора, выделенной клетки, содержащей полинуклеотид, кодирующий FLT3CAR, и антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, необязательно, биспецифического антитела. Носителем может быть фармацевтически приемлемый носитель. В одном из аспектов, представленных в настоящем документе, представлена композиция, содержащая или альтернативно, состоящая по существу или также состоящая из выделенной нуклеиновой кислоты или вектора, антитела, антигенсвязывающего фрагмента, полипептида, изолированной клетки и/или популяции клеток, раскрытой в настоящем документе, и, необязательно, фармацевтически приемлемого носителя.

В дополнительных аспектах, композиция может дополнительно содержать иммунорегуляторную молекулу и/или выделенную нуклеиновую кислоту, содержащую полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который необязательно распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1. В определенных вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит или альтернативно, состоит по существу из или дополнительно состоит из соответствующих областей CDR антитела к PD-1 и/или антитела к PD-L1, или эквивалента каждой из них и/или указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В определенных вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит или альтернативно, состоит по существу из или дополнительно состоит из соответствующих областей CDR антитела к PD-1 и/или антитела к PD-L1, или эквивалента каждой из них. В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит или альтернативно, альтернативно, состоит по существу из или дополнительно состоит из переменной области тяжелой цепи и/или легкой цепи антитела к PD-1 и/или PD-L1, и/или эквивалента каждой из них. В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий антигенсвязывающий домен PD-1 антитела, и/или одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий антигенсвязывающий домен PD-L1 антитела, и/или эквивалент каждого из них. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью:

Анти-PD-1 scFv:

CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGC
GTTAAAGTTTCTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGG
GTACGGCAGGCTCCAGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAA
CGGCGGCACTAACTTTAACGAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAACTGACT
CAAGTACGACTACAGCATACATGGAACTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTG
TCTATTATTGCGCGAGAAGAGACTATCGCTTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGC
AAGGTACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGGTGGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTCA

GGTGGAGGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCCCCAAGCTCTCTGTCCGCGTCA
GTGGGCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAGATGTGTCAACCGCTGTC
GCCTGGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCCTAAGCTTCTCATCTACTCAGCTTCT
TTTCTGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGGACGGACTTC
ACATTGACCATAAGTTCCTTGCAGCCTGAGGATTTCGCTACATATTATTGCCAACAG
TACCTTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG или ее эквивалентом.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), полученный из антитела к PD-L1, содержащий аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью:

Анти-PD-L1scFv:

GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCAC
TCCGGTTGTCCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGT
GCGCCAAGCCCCGGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGG
GTTCCACCTACTATGCTGATTCAGTAAAAGGACGGTTCACTATAAGCGCGGATACAA
GTAAGAATACTGCCTATCTTCAAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTAT
ATTATTGCGCTAGACGACATTGGCCAGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTC
TTGTGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGGCAGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGT
GGTTCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCCACATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAG
AGAGCAACTCTGTCATGCCGGGCGTCAAAAGGTGTCAGTACGTCAGGCTACTCCTAT
CTTCATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCTTCTCATATACCTGGCT
AGTTACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGGTCTGGGACTGAT
TTTACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACTATTGCCAA
CATTCACGCGATTTGCCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTTGAAATAAAA или ее эквивалентом.

В некоторых вариантах осуществления, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом является биспецифическое антитело. В определенных вариантах осуществления, биспецифическое антитело содержит или, альтернативно, состоит по существу из или дополнительно состоит из релевантных CDR областей антитела к PD-1 и/или антитела PD-L1, или эквивалента каждой из них. В определенных вариантах осуществления, биспецифическое антитело содержит или, альтернативно, состоит по существу из или дополнительно состоит из релевантных CDR областей антитела к PD-1 и/или антитела PD-L1, или эквивалента каждой из них. В некоторых вариантах осуществления, биспецифическое антитело содержит или, альтернативно, состоит по существу из или дополнительно состоит из переменной области тяжелой цепи и/или легкой цепи антитела к PD-1 и/или PD-L1, и/или эквивалента каждой из них. В некоторых вариантах осуществления, биспецифическое антитело содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий антигенсвязывающий домен PD-1 антитела и/или одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий антигенсвязывающий

домен PD-L1 антитела, и/или эквивалент каждого из них.

В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит ингибитор FLT3. Не будучи связанными теорией, полагают, что такой ингибитор может увеличивать поверхностную экспрессию FLT3 на клетках-мишенях. Неограничивающие примеры ингибиторов FLT3 включают гильтеритиниб (Astellas), квизаритиниб (Ambit Biosciences), мидостаурин (Novartis), сорафениб (Bayer and Onxy Pharmaceuticals), сунитиниб (Pfizer), лестарутиниб (Cephalon) и FF-10101 (Fuijfilm) и довитиниб (Novartis или Oncology Venture).

Коротко, фармацевтические композиции по настоящему раскрытию, включая, но не ограничиваясь ими, любую из заявленных композиций, как описано здесь, в комбинации с одним или несколькими фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или эксципиентами. Такие композиции могут содержать буферы, такие как нейтральный физиологический раствор с нейтральным буфером, физиологический раствор с фосфатным буфером и подобные; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия); и консерванты. Композиции по настоящему описанию могут быть составлены для перорального, внутривенного, местного, энтерального и/или парентерального введения. В определенных вариантах осуществления, композиции по настоящему раскрытию составлены для внутривенного введения.

Введение клеток или композиций можно осуществлять одной дозой, непрерывно или периодически на протяжении всего курса лечения. Способы определения наиболее эффективных средств и доз введения известны специалистам в данной области и будут варьироваться в зависимости от композиции, используемой для терапии, цели терапии и субъекта, которого лечат. Можно проводить однократное или многократное введение, где уровень дозы и схему дозирования выбирает лечащий врач. Подходящие дозированные формы и способы введения агентов известны в данной области. В дополнительном аспекте, клетки и композицию по раскрытию можно вводить в сочетании с другими видами лечения.

Клетки и популяции клеток вводят хозяину с использованием способов, известных в данной области и описанных, например, в международной заявке PCT № PCT/US2011/064191. Такое введение клеток или композиций по раскрытию может быть выполнено для создания животной модели желаемого заболевания, расстройства или состояния для экспериментальных и скрининговых анализов.

Способы применения

Терапевтическое применение. Аспекты, касающиеся способов настоящего раскрытия, относятся к способам ингибирования опухоли/рака у субъекта, нуждающегося в этом, и/или лечения онкологического пациента или субъекта, нуждающегося в этом. В настоящем документе представлены способы ингибирования роста рака или опухоли,

экспрессирующих FLT3, необязательно, острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) у субъекта, включающие или альтернативно, состоящие по существу из, или, также состоящие из контакта рака или опухоли с выделенной клеткой или композицией по настоящему описанию. В одном аспекте, способ ингибирования роста рака или опухоли, экспрессирующей FLT3, у субъекта, необязательно, острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), включает или альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из измерения экспрессии PD-1 и/или PD- L1 у субъекта и введения выделенной клетки, антитела, антигенсвязывающего фрагмента и/или композиции по настоящему изобретению субъекту, экспрессирующему PD-1 и/или PD-L1. Дополнительно в настоящем документе раскрыты способы ингибирования роста рака или опухоли у субъекта, необязательно, острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), включающие или, альтернативно, состоящие по существу из, или, также дополнительно состоящие из измерения экспрессии PD-1 и/или PD-L1 у субъекта и введения антитела, антигенсвязывающего фрагмента и/или композиции субъекту, экспрессирующему PD-1 и/или PD-L1. Контакт может происходить in vitro или in vivo. В некоторых вариантах осуществления, если контакт происходит in vivo и выделенные клетки являются аутологичными лечимому субъекту. В других вариантах осуществления, если контакт происходит in vivo, выделенные клетки являются аллогенными лечимому субъекту. В некоторых вариантах осуществления, раком является рак, поражающий кровь и/или костный мозг; в некоторых вариантах осуществления, раком является острый миелоидный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления, опухолевая/раковая клетка экспрессирует или сверхэкспрессирует FLT3 и, необязательно, PD-1. В определенных вариантах осуществления, эти способы включают или, альтернативно, состоят по существу из или дополнительно состоят из введения субъекту или пациенту эффективного количества выделенной клетки или композиций, раскрытых в настоящем документе. В других вариантах осуществления, эта выделенная клетка содержит или экспрессирует CAR и/или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который, необязательно, распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1. В определенных вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит или, альтернативно, состоит по существу из или дополнительно состоит из релевантных CDR областей антитела к PD-1 и/или антитела к PD-L1, или эквивалента каждой из них. В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит или, альтернативно, состоит по существу из или дополнительно состоит из переменной области тяжелой цепи и/или легкой цепи антитела к PD-1 и/или PD-L1, и/или эквивалента каждой из них. В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий антигенсвязывающий домен PD-1 антитела, и/или одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий антигенсвязывающий домен PD-L1 антитела, и/или эквивалент каждого из них. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью:

Анти-PD-1 scFv:

CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGC
GTTAAAGTTTCTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGG
GTACGGCAGGCTCCAGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAA
CGGCGGCACTAACTTTAACGAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAACTGACT
CAAGTACGACTACAGCATACATGGAACTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTG
TCTATTATTGCGCGAGAAGAGACTATCGCTTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGC
AAGGTACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGGTGGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTCA
GGTGGAGGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCCCCAAGCTCTCTGTCCGCGTCA
GTGGGCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAGATGTGTCAACCGCTGTC
GCCTGGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCCTAAGCTTCTCATCTACTCAGCTTCT
TTTCTGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGGACGGACTTC
ACATTGACCATAAGTTCCTTGCAGCCTGAGGATTTCGCTACATATTATTGCCAACAG
TACCTTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG или ее эквивалентом.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), полученный из антитела к PD-L1, содержащий аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью:

Анти-PD-L1 scFv:

GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCAC
TCCGGTTGTCCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGT
GCGCCAAGCCCCGGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGG
GTTCCACCTACTATGCTGATTCAGTAAAAGGACGGTTCACTATAAGCGCGGATACAA
GTAAGAATACTGCCTATCTTCAAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTAT
ATTATTGCGCTAGACGACATTGGCCAGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTC
TTGTGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGGCAGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGT
GGTTCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCCACATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAG
AGAGCAACTCTGTCATGCCGGGCGTCAAAAGGTGTCAGTACGTCAGGCTACTCCTAT
CTTCATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCTTCTCATATACCTGGCT
AGTTACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGGTCTGGGACTGAT
TTTACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACTATTGCCAA
CATTCACGCGATTTGCCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTTGAAATAAAA или ее эквивалентом.

В некоторых вариантах осуществления, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом является биспецифическое антитело. В определенных вариантах осуществления, биспецифическое антитело содержит или, альтернативно, состоит по существу из или дополнительно состоит из релевантных CDR областей антитела к PD-1 и/или антитела PD-L1, или эквивалента каждой из них. В определенных вариантах осуществления, биспецифическое антитело содержит или, альтернативно, состоит по

существу из или дополнительно состоит из релевантных CDR областей антитела к PD-1 и/или антитела к PD-L1, или эквивалента каждой из них. В некоторых вариантах осуществления, биспецифическое антитело содержит или, альтернативно, состоит по существу из или дополнительно состоит из переменной области тяжелой цепи и/или легкой цепи антитела к PD-1 и/или PD-L1, и/или эквивалента каждой из них. В некоторых вариантах осуществления, биспецифическое антитело содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий антигенсвязывающий домен PD-1 антитела, и/или одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий антигенсвязывающий домен PD-L1 антитела, и/или эквивалент каждого из них.

В еще дополнительных вариантах, выделенная клетка является Т-клеткой или NK-клеткой. В некоторых вариантах осуществления, выделенная клетка является аутологичной или аллогенной по отношению к субъекту или пациенту, проходящему лечение. В дополнительном аспекте, опухоль/рак экспрессирует FLT3, и субъект был выбран для терапии с помощью диагностики, такой как описана здесь. Субъектом является животное, млекопитающее, собака, кошка, бык, лошадь, мышь или пациент-человек.

Клетки FLT3 CAR, раскрытые в настоящем документе, можно вводить либо отдельно, либо в комбинации с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, необязательно биспецифическим антителом, раскрытым в настоящем документе, разбавителями, известными противораковыми терапевтическими агентами и/или с другими компонентами, такими как цитокины или другие популяции клеток, являющихся иммунорегуляторными. Их можно вводить как терапию первой линии, терапию второй линии, терапию третьей линии или дополнительную терапию. Неограничивающие примеры дополнительных терапий включают циторедуктивную терапию, такую как хирургическое вмешательство, радиационную терапию, криотерапию или химиотерапию, или биопрепараты, такие как трансплантация гемопоэтических стволовых клеток. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления способы ингибирования роста рака или опухоли, раскрытые в настоящем документе, могут дополнительно включать, или альтернативно, состоять по существу из или дополнительно состоять из введения субъекту эффективного количества циторедуктивной терапии. В одном аспекте, циторедуктивная терапия содержит или альтернативно, состоит по существу из или дополнительно состоит из химиотерапии, криотерапии, гипертермии, таргетной терапии и/или радиацонной терапии. В некоторых вариантах осуществления, клетки FLT3 CAR можно вводить до или после любой из этих неограничивающих типовых терапий, например, перед трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток или после радиационной терапии или химиотерапии. В вариантах осуществления, в которых клетки FLT3 CAR используются перед трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, клетки FLT3 CAR можно использовать для достижения ремиссии перед доставкой гемопоэтических стволовых клеток; в целом трансплантация гемопоэтических стволовых клеток более успешна после ремиссии. Дополнительные неограничивающие примеры

включают другие соответствующие типы клеток, такие как немодифицированные иммунные клетки, модифицированные иммунные клетки, содержащие векторы, экспрессирующие одну или несколько иммунорегуляторных молекул, или клетки CAR, специфичные к другому антигену, чем те, которые раскрыты в настоящем документе. Как и клетки CAR по настоящему раскрытию, в некоторых вариантах осуществления эти клетки могут быть аутологичными или аллогенными. Подходящие схемы лечения будет определять лечащий врач или ветеринар.

Способы можно персонализировать, предварительно определив пациента, который будет получать терапию. В одном аспекте, субъектом или пациентом является животное, млекопитающее, собака, кошка, бык, лошадь, мышь или пациент-человек. В этом аспекте, образец раковых или опухолевых клеток выделяют у пациента, чтобы определить, экспрессирует ли клетка FLT3 и/или PD-1 и/или PD-L1. Если определено, что клетка экспрессирует один или более из этих маркеров, пациента выбирают для получения терапии, и терапия вводится. Способы определения экспрессии маркеров известны в данной области. Некоторые такие способы описаны здесь.

В некоторых вариантах осуществления, клетки FLT3 CAR вводят с ингибитором FLT3. Не будучи связанными теорией, полагают, что такой ингибитор может увеличивать поверхностную экспрессию FLT3 на клетках-мишенях. Неограничивающие примеры ингибиторов FLT3 включают гильтеритиниб (Astellas), квизаритиниб (Ambit Biosciences), мидостаурин (Novartis), сорафениб (Bayer and Onxy Pharmaceuticals), сунитиниб (Pfizer), лестарутиниб (Cephalon) и FF-10101 (Fuijfilm) и довитиниб (Novartis или Oncology Venture).

В некоторых вариантах осуществления, у пациента или субъекта сохраняется или восстанавливается нормальный гемопоэз после получения, т.е. введения, эффективного количества выделенной клетки. Нормальный гемопоэз является критической конечной точкой для некоторых видов рака, таких как, но не ограничиваясь ими, раки, поражающие кровь или костный мозг, например, лимфома или лейкоз, например острый миелоидный лейкоз или острый лимфобластный лейкоз. Способы определения «нормального гемопоэза» после лечения известны в данной области и включают, но не ограничиваются этим, анализ крови «уколом булавкой», сравнивающий исходное количество клеток крови с количеством клеток крови после лечения и/или аналогичные сравнения для CD34+ клеток в кровотоке. Дополнительные неограничивающие иллюстративные методы включают биопсию костного мозга для проверки приживления трансплантата. Неспособность поддерживать или восстанавливать нормальный гемопоэз (также известный как нормальное приживление) связана с повторяющейся потребностью в переливаниях крови и/или потребностью в антибиотиках и/или высокой заболеваемостью и смертностью, в дополнение к симптоматическим показателям, таким как, но не ограниченным ими, анемия, бледность, ортостатическая гипотензия и кровотечение и/или кровоподтеки из-за недостаточного восстановления тромбоцитов. Нормальный гемопоэз и/или приживление может быть определен клинически приемлемым порогом, таким как,

но не ограниченным ими, постоянное содержание гранулоцитов >1,0 x 10^9/л, постоянное содержание тромбоцитов >50 x 10^9, постоянный уровень гемоглобина ~9 или 10 г/дл и/или отсутствие необходимости в переливании красных клеток крови. В некоторых вариантах осуществления нормальный гемопоэз определяется отсутствием значительного истощения Lin-CD34+CD38-CD90+CD45RA- клеток. В некоторых вариантах осуществления, адекватный долговременный гемопоэз или успешное долговременное приживление может коррелировать с достаточным количеством Lin-CD34+CD38-CD90+CD45RA- клеток в гемопоэтическом продукте, вливаемом субъекту после миелоаблативной подготовки для трансплантации стволовых клеток.

Фармацевтические композиции по настоящему описанию можно вводить способом, соответствующим заболеванию, которое необходимо лечить или предотвращать. Количество и частота введения будут определяться такими факторами, как состояние пациента и тип и тяжесть заболевания пациента, хотя соответствующие дозировки могут определяться клиническими испытаниями. В одном из аспектов они вводятся непосредственно, путем прямой инъекции, или системно, например внутривенной инъекцией или инфузией.

Общая доза клеток, экспрессирующих CAR, может варьироваться в зависимости от, например, описанных выше факторов. В некоторых вариантах осуществления, дозы могут быть порядка от 1 до 10^{10} клеток, например, по меньшей мере, 10, по меньшей мере, 10^1, по меньшей мере, 10^2, по меньшей мере, 10^3, по меньшей мере, 10^4, по меньшей мере, 10^5, по меньшей мере, 10^6, по меньшей мере, 10^7, как максимум 10^8, как максимум 10^9, как максимум 10^{10}, от 10^2 до 10^{10}, от 10^3 до 10^9, от 10^4 до 10^8. В некоторых вариантах осуществления, доза может быть дополнительно ограничена целочисленным коэффициентом до порядка величины, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9, давая интервал доз, перечисленный в следующем не ограничивающем примере: от 5 x 10^4 и 1x1081 x 10^8.

Ген самоубийства. В вариантах осуществления, включающих ген самоубийства как часть выделенной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, ген самоубийства можно использовать для остановки клеток, экспрессирующих CAR, в конце терапии. В аспектах способа, включающих клетки, экспрессирующие CAR, содержащие ген самоубийства, ген самоубийства может быть индуцирован введением молекулы-индуктора в момент, когда больше не требуется ответ клетки CAR, специфической для FLT3. Индукция гена самоубийства приводит к апоптозу клеток CAR. Таким образом, предполагается, что использование конструктов CAR, содержащих индуцируемый ген самоубийства, может повысить безопасность применения клеток CAR за счет удаления клеток, эксперессирующих CAR, посредством индуцированного апоптоза. В вариантах осуществления, где используется индуцирующий агент, такой как, но не ограниченный ими, малая молекула, доза индуцирующего агента, применяемая для индукции экспрессии гена самоубийства, может находиться в диапазоне от 0,001 до 10,0 мг/кг массы тела или, альтернативно, от 0,01 до 1,0 мг/кг и между ними.

Диагностическое применение. Аспекты раскрытия представляют типовой способ

определения того, будет ли пациент отвечать на терапию FLT3 CAR или не ответит на нее. В конкретных вариантах осуществления, этот способ включает контакт биологического образца, выделенного у пациента, с эффективным количеством анти-FLT3 и/или PD-L1 и/или PLD1 антитела и определение присутствия любого антитела, связанного с образцом рака/опухоли. В некоторых вариантах осуществления, образцом опухоли является любой биологический образец, включая раковые/опухолевые клетки, например, биопсию опухоли, раковые/опухолевые клетки кровотока и/или любая другая жидкость или ткань организма, которые могут содержать клетки. В других вариантах осуществления, наличие антитела или антител, связанных с образцом рака/опухоли, указывает на то, что пациент, вероятно, будет отвечать на терапию FLT3 CAR, и отсутствие антител, связанных с образцом опухоли, указывает на то, что пациент, скорее всего, не ответит на терапию FLT3 CAR. В некоторых вариантах осуществления, антитело может связывать от 0% до 100% образца рака/опухоли, взятого у пациента, может содержать клетки, которые являются FLT3 положительными; в таких вариантах осуществления следует понимать, что чем выше процент FLT3 и/или PD-1 и/или PD-L1 положительных опухолевых клеток, тем выше вероятность того, что терапия FLT3 CAR будет эффективной. В некоторых вариантах осуществления, образец рака/опухоли содержит лейкозные бласты. В других вариантах осуществления, обнаружение большего или примерно 90% лейкозных бластов, экспрессирующих FLT3, и/или обнаружение по меньшей мере, 50% PD-1 и/или PD-L1 указывает на то, что у пациента есть благоприятное «терапевтическое окно» для FLT3 CAR терапии. В некоторых вариантах осуществления, способ включает использование диагностических анализов, маркеров или профилей экспрессии генов, связанных с опухолью или раком - неограничивающим примером является количественная оценка популяции клеток, экспрессирующих $CD45^{dim}SSC^{medium}$, с использованием проточной цитометрии или другого способа сортировки клеток, чтобы определить, было ли снижение ОМЛ относительно базовой популяции этих же клеток. В некоторых вариантах осуществления, способ включает дополнительную стадию введения эффективного количества клеток, экспрессирующих FLT3 CAR, и антител, раскрытых в настоящем документе, пациенту, у которого определена вероятность ответа на терапию FLT3 CAR. В некоторых вариантах осуществления, у пациента есть и/или диагностирован рак/опухоль, экспрессирующая FLT3. В некоторых вариантах осуществления, раком/опухолью является лимфома или лейкоз, например, но не ограничиваясь ими, ОМЛ или ОЛЛ.

Наборы

Как изложено в данном документе, настоящее описание представляет способы получения и введения клеток FLT3 CAR и антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего антигенсвязывающий домен, который распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1. В одном конкретном аспекте, настоящее описание представляет наборы для выполнения этих способов, а также инструкции для выполнения способов настоящего раскрытия, таких как сбор клеток и/или тканей, и/или выполнение

скрининга/трансдукции/и т. д. и/или анализа результатов.

В одном аспекте, набор содержит или, альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из выделенных нуклеиновых кислот, раскрытых в настоящем документе, и/или одного или нескольких векторов, содержащих указанные нуклеиновые кислоты и/или выделенные аллогенные клетки, предпочтительно, Т-клетки или NK-клетки, и/или инструкции по получению аутологичных клеток у пациента. В другом аспекте, в настоящем документе представлены наборы, содержащий или, альтернативно, состоящий по существу из, или, также дополнительно состоящий из композиции, раскрытой в настоящем документе, и, необязательно, инструкции по применению. Такой набор может также содержать, или, альтернативно, состоять по существу из, или дополнительно содержать среду и другие реагенты, подходящие для трансдукции и/или селекции и/или активации и/или размножения клеток, экспрессирующих FLT3 CAR, таких как раскрыты в настоящем документе.

В одном аспекте, набор содержит или альтернативно, состоит по существу из, или дополнительно состоит из выделенной клетки, экспрессирующей CAR, или ее популяции. В некоторых вариантах осуществления, клетки этого набора могут потребовать активации и/или размножения перед введением субъекту, нуждающемуся в этом. В других вариантах осуществления, набор может дополнительно включать или состоять по существу из среды и реагентов, таких как описаны в раскрытии выше, для активации и/или размножения выделенной клетки, экспрессирующей CAR. В некоторых вариантах осуществления, клетка должна использоваться для терапии FLT3 CAR. В других вариантах осуществления, набор содержит инструкции по введению выделенной клетки пациенту, нуждающемуся в терапии FLT3 CAR.

Наборы по настоящему описанию также могут содержать, например, буферный агент, консервант или стабилизирующий белок агент. Наборы могут дополнительно включать компоненты, необходимые для обнаружения определяемой метки, например, фермент или субстрат. Наборы также могут содержать контрольный образец или серию контрольных образцов, которые могут быть проанализированы и сравнены с испытуемым образцом. Каждый компонент набора может быть заключен в отдельный контейнер, и все разные контейнеры могут находиться в одной упаковке вместе с инструкциями по интерпретации результатов анализов, выполненных с использованием набора. Наборы по настоящему изобретению могут содержать письменный продукт на контейнере набора или в нем. Письменный продукт описывает, как использовать реагенты, содержащиеся в наборе.

При необходимости эти предлагаемые компоненты набора могут быть упакованы обычным способом для использования специалистами в данной области. Например, эти предлагаемые компоненты набора могут быть представлены в растворе или в виде жидкой дисперсии или подобного.

Следующие ниже примеры иллюстрируют процедуры, которые можно использовать в различных случаях для реализации раскрытия.

ПРИМЕР 1 – FLT3 CAR и СЕКРЕТИРОВАННЫЕ PD-1/PD-L1

FLT3 CAR Т-клетки не только индуцируют времязависимую и дозозависимую цитотоксичность против FLT3(+) ОМЛ клеточной линии, но также уничтожают вплоть 40% FLT3(+) первичных бластов у ОМЛ пациента в всего за 4 часа. Более важно, заявитель обнаружил, что CAR NK-клетки или NK-клетки в пролонгированной культуре экспрессируют существенные количества белка контрольной точки PD-1, который является ингибирующим сигналом на NK-клетках онкологического пациента, в то время как ОМЛ бласты экспрессируют PD-L1 на поверхности клетки. Исходя из этих предыдущих биспецифических платформ и других групп, главной проблемой биспецифических антител («biAb») является короткий период полувыведения, ограничивающий биодоступность и эффективность. Поэтому, заявитель стремился преодолеть это техническое ограничение и предоставить синергетическую цитолитическую активность против ОМЛ за счет повышенного взаимодействия, повышенной активации и антагонистического ингибирования контрольных точек.

Эффективность CAR NK-клеток

Эффективность CAR NK-клеток, конститутивно секретирующих анти-PD-1-PD-L1 biAb, может быть оценена in vitro. Были созданы FLT3 CAR-NK клоны с непрерывной и высокой секрецией PD-1-PD-L1 биспецифического антитела, и повышение цитоткосичности против ОМЛ клеточных линий и бластов пациента может быть тестировано in vitro.

Чтобы это сделать, анти-PD-1-PD-L1 biAb создают и вводят в FLT3 CAR лентивирусный вектор. biAb содержит scFvs из анти-PD-1 и анти-PD-L1 антитела с HMA линкером. Экспрессия анти-PD-1scFv-HMA-анти-PD-L1scFv фрагмента управляется CMV промотором и сигнальным пептидом секреции, выделенным из молекул иммуноглобулина человека.

Для тестирования эффективности CAR NK-клеток, конститутивно секретирующих анти-PD-1-PD-L1 biAb in vitro, FLT3 CARЮ несущий новые анти-PD-1-PD-L1 биспецифические антитела, трансдуцируют в клетки. Так как перенос одного гена через лентивирусную систему лучше, чем два раунда трансдукции с точки зрения эффективности и безопасности, бицистронный вектор экспрессии, имеющий клиническую степень очистки, экспрессирующий и FLT3, и biAb, является предпочтительным. CAR Т-клетки, трансдуцированные с такими бицистронными FLT3 векторами, вызывают мощную и специфическую цитолитическую активность против FLT3(+) ОМЛ клеток. Не будучи связанными теорией, полагают, что FLT3 CAR перенаправляют NK-клетки против FLT3(+) мишеней, в то время как анти-PD-1-PD-L1 biAb привлекают и эффектор и мишень и действуют как ингибитор контрольной точки.

Также может оцениваться бицистронный вектор экспрессии и индукция поверхностноклеточной экспрессии FLT3 CAR и непрерывной секреции анти-PD-1-PD-L1 биспецифических антител. Период полувыведения и биодоступность biAb оценивают из-за их небольшого размера. Не будучи связанными теорией, полагают, что вставка

секреторного biAb гена в FLT3 CAR вектор улучшает период полувыведения и биодоступность биспецифических антител.

Экспрессия FLT3 CAR может быть определена окрашиванием анти-Fab антителом и проточной цитометрией. Экспрессию белка biAb оценивают через блокирование секреторного пути с брефелдином А, и клетку пермеабилизируют и окрашивают анти-6ХГистидиновым (6XHis) антителом. Скриннинг ELISA для 6XHis может применяться для отбора кандидатов с высокой экспрессией для анти-PD-1-PD-L1 biAb. FLT3 CAR определяют на поверхности клетки. Когда трансдуцированные клетки окрашены внутриклеточно для анти-6XHis антитела, biAb определяются проточной цитометрией и количественно оцениваются с применением ELISA. По меньшей мере, один высший экспрессер и FLT3 CAR и анти-PD-1-PD-L1 biAb предпочитают и выбирают. Заявитель отмечает, что, в некоторых случаях, искусственная экспрессия двух белков может застрессовать клетки и инициировать реакцию неправильной укладки белка, и может возникнуть массовая гибель клеток. Этого можно избежать, используя клинически безопасные промоторы с разной управляющей силой для оптимизации экспрессии.

Заявитель также смог определить, является ли обработка FLT3 CAR-PD-1-PD-L1 biAb лучше, чем обработка только FLT3 CAR in vitro. FLT3 CAR вызывает вплоть до 40% цитотоксичности против ОМЛ бластов пациента. Уровень цитотоксичности может быть дополнительно увеличен, если ингибирующие контрольные точки блокированы biAb.

Параллельное сравнение цитотоксичности против клеточных линий ОМЛ MOLM-13, K562 и U937, которые имеют высокий, средний и низкий уровень экспрессии PD-L1, соответственно, проводят для сравнения цитотоксичности с или без CAR или анти-PD-1-PD-L1 biAb. Также можно оценить 1-PD-L1 biAb. Продуцирование IFN-γ в совместных культурах с или без CAR или биспецифических антител может быть измерено и сравнено. Чтобы доказать взаимодействие, предварительно меченые эффекторные клетки, которые сверхэкспрессируют секреторную вставку biAb (анти-PD-1-PD-L1CAR NK-клетки), и предварительно меченые ОМЛ клетки культивируют совместно в течение 30 мин. Затем клетки собирают и окрашивают флуорофором, меченным фаллоидином. Окрашенные клетки анализируют с помощью проточного цитометра с визуализацией Imagestream X Marker II. Частоту иммунного синапса количественно оценивают и сравнивают с контрольными клетками после применения стратегии жесткого гейтирования. Для определения действия блокирования PD-1 на сигнальные пути NK-клеток и CAR, измеряют фосфорилирование SHP2 (ниже передачи сигнала PD-1), AKT (ниже передачи сигнала CD28) и zap70, ниже передачи сигнала TCR. Взаимодействие эндогенной экспрессии PD-1 на CAR NK-клетках и экспрессии PD-L1 на ОМЛ клетках является антагонистическим, и увеличение специфического лизиса наблюдается в совместных культурах в группе комбинированного лечения. Частота иммунного синапса при совместном культивировании с анти-PD-1-PD-L1CAR NK-клетками выше, чем в отрицательном контроле, включая пустой векторный контроль и контроль без мишени. Более низкая экспрессия SHP2 определяется в CAR NK с biAb, тогда как AKT и zap70

будут фосфорилироваться после обработки анти-PD-1-PD-L1 biAb. Хотя NK-клетки или Т-клетки экспрессируют как PD-1, так и PD-L1 и, таким образом, анти-PD-1-PD-L1 biAb может взаимодействовать с PD-1 или PD-L1 на эффекторных клетках, CAR на эффекторных клетках перенаправляются только на FLT3(+) клетки, которые ограничены злокачественными ОМЛ и миелоидными клетками. Это обеспечивает специфичность и безопасность.

CAR-NK биспецифические клетки продлевают выживаемость

Клоны CAR-NK (NK92) с секретированным PD-1-PD-L1 (biAb-FLT3 CAR NK) тестируют для определения того, продлевают ли клетки выживаемость в моделях ксенотрансплантатов и лейкозных стволовых клеток, полученных от пациентов ОМЛ, у мышей. Заявитель обнаружил, что мыши с ОМЛ, леченные CAR-NK с секретированным PD-1-PD-L1 biAb, выживают дольше, чем мыши с только лейкозом или леченные только CAR.

Заявитель также оценивал, индуцирует ли FLT3CAR NK-клетка значительную цитолитическую активность среди клеточных линий ОМЛ и бластов пациента. FLT-3 CAR конструируют и экспрессируют на первичных CD3(+) Т и NK-клеках человека. CAR NK-клетки специфически уничтожают клеточные линии FLT3(+) ОМЛ MOLM-3 и EOL-1, но не отрицательную контрольную клеточную линию U937 (**ФИГ. 2А**). Также, CAR Т-клетки индуцируют цитолитическую активность против FLT3(+) бластов от пациентов с ОМЛ, но не FLT3(-) ОМЛ бластов (**ФИГ. 2В**). Не возникает значительного уничтожения нормальных клеток человека, включая CD34(+) гемопоэтические стволовые клетки, дендритные клетки, NK и В-клетки, хотя они экспрессируют FLT-3 (**ФИГ. 2С**). Это позволяет предположить, что FLT3CAR Т- или NK-клетки могут быть безопасными.

FLT3 CAR Т-клетки продлевают выживаемость мышей, имеющих MOLM-13 ОМЛ клетки и первичные ОМЛ бласты от пациентов. NOD-SCID$^{IL\text{-}2\gamma c\text{-}/\text{-}}$ мышей, которые введены инъекцией клеточные линии ОМЛ или первичные ОМЛ бласты, применяют в качестве моделей ОМЛ бластов пациента. Все мыши, имеющие MOLM-13 клетки и FLT3 CAR Т-клетки выжили в течение более 80 дней после имплантации клеток MOLM-13 ОМЛ (**ФИГ. 3А**), по сравнению с контрольными мышами, которые получили Т-клетки, трансдуцированные пустым вектором, которые умерли через приблизительно 20 дней после имплантации клеток MOLM-13 ОМЛ. Также, мыши, имеющие только ОМЛ бласт человека, умерли через примерно 90 дней. Наоборот, те, которые получили FLT3CAR Т-клетки, выжили в течение более чем 120 дней без симптомов ОМЛ (**ФИГ. 3В**). Данные заявителя показывают, что FLT3 CAR экспрессировались на NK-клетках человека. Такие же результаты были определены для FLT3CAR NK-клеток (**ФИГ. 3С**).

FLT3 CAR Т-клетки экспрессируют PD-1 во время фазы размножения, и ОМЛ бласты экспрессируют PD-L1. Заявитель обнаружил, что FLT3 CAR NK-клетки экспрессируют высокий уровень PD-1 в культуре. Доля PD-1(+) CAR NK-клеток была более 90% через 7 дней в культуре (**ФИГ. 4А**). Первичные NK-клетки без трансдукции CAR также экспрессируют PD-1 в присутствии цитокинов гамма цепи **(ФИГ. 4В)**. Кроме

того, клеточные линии ОМЛ экспрессируют PD-L1 на разных уровнях. Высокие экспрессеры включают K562; и низкие экспрессеры включают Molm-13 (**ФИГ. 4C-D**). Эти результаты позволяют предположить, что PD-1-PD-L1 ось играет потенциальную роль в цитотоксичности CAR-NK против ОМЛ клеток. Заявитель также обнаружил, что 10 нг/мл могут определяться в супернатантах культуры Т-клеток, трансдуцированных с biAb вектором через 3 дня после трансдукции (**ФИГ. 4E**).

Эти результаты продемонстрировали, что FLT3 CAR T- или NK-клетки могут защитить большинство мышей с ОМЛ от гибели. Не будучи связанными теорией, полагают, что через антагонизм к PD-1 и PD-L1 с секретированным biAb, CAR NK-клетки защищают мышей от ОМЛ LSC (лейкозных стволовых клеток при ОМЛ).

Заявитель также протестировал, является ли лечение FLT3 CAR-PD-1-PD-L1 biAb лучшим по сравнению с только CAR FLT3 у мышей с ОМЛ. Данные показывают, что хотя FLT3 CAR Т-клетки могут продлевать выживаемость в модели ОМЛ у мышей, CAR Т-клетки экспрессируют высокий уровень PD-1. Заявитель также определил повышенную экспрессию PD-1 в CAR NK-клетках. Поэтому, заявитель полагает, что антагонизм к PD-1-PD-L1 с biAb усиливает функции CAR и уничтожает клетки ОМЛ в модели ОМЛ у мышей, созданной с использованием либо клеточной линии, либо ксенотрансплантата, полученного от пациента.

Nod scid gamma (NSG) мышам инокулируют трансдуцированные люциферазой MOLM-13, клеточную линию FLT3(+) ОМЛ. Через неделю после инокуляции, FLT3 CAR-NK с или без анти-PD-1-PD-L1 biAb вводят внутривенной инъекцией. Кинетику введенных клеток ОМЛ отслеживают еженедельно с применением IVIS Lumina II через измерение сигналов биолюминесценции от клеток ОМЛ. В конкретный момент времени (выведенный из визуализации in vivo), заявитель собирает кровь, костный мозг и селезенку и определяет абсолютное количество ОМЛ и NK-клеток. PD-1 экспрессию на CAR NK-клетках определяют проточной цитометрией в образцах периферической крови, собираемых каждую неделю. Эксперимент может быть повторен посредством инъекции первичных ОМЛ бластов пациента, стратифицированных по доле экспрессии FLT3. Также можно определить экспрессию PD-L1 на введенных инъекцией ОМЛ клетках. Концентрацию анти-PD-1-PD-L1 biAb измеряют регулярно через ELISACAR NK-клетки с анти-PD-1-PD-L1 biAb, сохраняющиеся или пролиферирующие лучше, чем без него, in vivo. Экспрессия PD-1 или PD-L1 на CARNK- и ОМЛ клетках, соответственно, не определяется в CAR-NK с biAb. Кроме того, биолюминесценция из ОМЛ клеток была самой низкой в группе biAb-FLT3 CAR NK. Значительно более длительное выживание без заболевания показано у мышей, получавших лечение biAb-FLT3 CAR NK. Анти-PD-1-PD-L1 biAb тестируют регулярно в образцах плазмы. В некоторых случаях, действие biAb может зависеть от действия других иммунных клеток в PBMC. В таких случаях, заявитель может совместно вводить инъекцией аутологические PBMC и biAb-FLT3CAR NK-клетки в модели ОМЛ у мышей и сравнивать с теми, в которых PBMC не вводили.

Заявитель также определил, уничтожают ли PD-1-PD-L1 biAb-FLT3 CARNK-

клетки лейкозные стволовые клетки (LSC) и защищают ли мышей от рецидива. Лейкозные стволовые клетки впервые описаны в ОМЛ как небольшое подмножество ОМЛ бластов, обычно CD34(+)CD38(–)CD123(+), которые могут регенерировать в массовую популяцию ОМЛ бластов. Это клинически актуально, так как стандартное лечение дублирует этот компартмент при ОМЛ, что приводит к рецидиву и резистентности к лечению у пациента с ОМЛ. Хорошо известно, что обогащенная популяция лейкозных стволовых клеток несет внутреннюю тандемную дупликацию гена FLT3.

Анализы цитотоксичности проводят in vitro с применением образцов, обогащенных для LSC. Образцы от пациентов с ОМЛ обогащают сортировкой для CD34(+)CD38(-)CD123(+) клеток. FLT3 CAR-NK или biAb-FLT3 CARNK-клетки обогащают сортировкой для CD34(+)CD38(+) клеток. Заявитель также измерил продуцирование IFN-γ в двух группах клеток и сравнил с клетками, трансдуцированными только мишенью/только эффектором. In vivo, NOD-SCIDIL2γc-/- мышей (самок и самцов) облучают при 100 рад за день до инъекции лейкозных клеток. Через один день LSC определяют как CD34(+)CD38(-)CD123(+) и отрицательный контроль CD34(+)CD38(+) заново сортируют на проточно-цитометрическом клеточном сортере (BD Aria III) и 1×10^6 отсортированных LSC или контрольных клеток вводят инъекцией через хвостовую вену. В это время, первичные NK-клетки трансдуцируют конструктами для только FLT3 CAR, только biAb NK или biAb-FLT3 CAR. Затем мышей произвольно распределяют на 5 разных групп: 1. только ОМЛ, 2. ОМЛ+NK-клетка-пустой вектор, 3. ОМЛ+FLT3 CAR NK, 4. ОМЛ+biAb-NK и 5. ОМЛ+biAb-FLT3 CAR-NK. 1×10^6 трансдуцированных NK-клеток вводят внутривенно через день после вливания LSC. Через 12-14 недель, приживление проверяют, собирая образцы периферической крови. Отслеживают выживаемость мышей. В конечный момент времени, частоту LSC анализируют проточной цитометрией. biAb-FLT3 CARNK-клетки лизируют LSC, по меньшей мере, так же эффективно, как клетки в не-LSC компартменте. Лечение и CAR и biAb предотвращает рецидив ОМЛ. Наблюдают более длительную выживаемость без заболевания. В некоторых случаях, все LSC могут быть уничтожены CAR NK-клетками, влитыми через день после вливания, что делает невозможным определение эффекта повторной популяции LSC. В таких случаях, заявитель может повторить эксперимент, но влить NK-клетки через 12-14 недель после приживления LSC.

Безопасность

Безопасность biAb-FLT3 CARNK-клеток тестируют in vivo с использованием модели гуманизированного ОМЛ, полученного у пациента, у мышей. У мышей, леченных FLT3 CAR-NK и анти-PD-1-PD-L1 biAb, не наблюдают серьезного цитокинового шторма.

Заявитель заметил, что FLT3 CAR T-клетки не уничтожают стволовые клетки CD34(+).Не будучи связанными теорией, заявитель полагает, что biAb-FLT3 CAR NK сохраняет нормальные стволовые клетки и обеспечивает специфическую цитотоксичность против FLT3(+) клеток ОМЛ. Однако, поскольку FLT3 экспрессирован как на миелоидных, так и на стволовых клетках, FLT3 CAR NK-клетки могут быть

протестированы, чтобы определить, истощены ли нормальные гемопоэтические стволовые клетки и существует ли риск цитопении.

Заявитель также протестировал, будет ли FLT3 CAR-NK с секреторным biAb уничтожать нормальные FLT3(+) клетки. Не будучи связанными теорией, полагают, что антагонизм в отношении PD-1/PD-L1 оказывает синергетическое действие на активацию CAR. Это может увеличить риск цитотоксичности в отношении всех нормальных FLT3(+) клеток, даже если они могут только незначительно экспрессировать FLT3. Соответственно, анализы цитотоксичности проводят с использованием biAb-FLT3 CAR NK в качестве эффекторов и нормальных CD34 (+) стволовых клеток, выделенных из пуповинной крови, в качестве мишени при различном соотношении эффектор/мишень.

Для подтверждения in vitro данных, используют NSG-SGM3 (NSGS) мышей, которые экспрессируют IL3, GM-CSF и SCF человека. И CD34(+) стволовые клетки человека, и FLT3 CAR NK-клетки или biAb-FLT3 CAR NK, вводят внутривенно в количестве 5×10^4 клеток на мышь. Через месяц или три месяца всех мышей умерщвляют и определяют приживление CD45(+) клеток человека в костном мозге. Анти-PD-1-PD-L1 biAb не влияет на FLT3 CAR NK-клетки на нормальных гемопоэтических стволовых клетках. Кроме того, доля CD45(+) клеток у мышей, которым вводили FLT3 CAR-NK с секреторным анти-PD-1-PD-L1 biAb, является такой же или подобной той, которую получают только FLT3 CAR.

Статистические аспекты

Для всех расчетов мощности тесты являются двусторонними. Заявитель использует логарифмические преобразования для большинства непрерывных измерений и арксинусные преобразования квадратного корня для долей, оба которых обладают превосходными свойствами стабилизации дисперсии для объединения дисперсии. Несмотря на то, что метод Бонферрони используют для контроля ошибок I типа в расчетах мощности, метод Холма или более мощный метод будет использоваться при анализе данных, когда выполняются парные сравнения. Кривые Каплана-Мейера строят для отображения результатов выживаемости. Линейные модели смешанных эффектов используют для обнаружения тенденции изменений продуцирования IFN-γ из образцов крови, повторно взятых во время исследования выживаемости мышей. Для анализа используют два образца t-критерия. Чтобы изучить различия в количестве CAR NK-клеток между группами, в каждую группу включены восемь мышей, которые достигают 80% мощности для обнаружения, по меньшей мере, двукратного эффекта (α=0,05/3 для корректировки для двух групп лечения и одной группы только ОМЛ, CV=50%). Для анализа будут использоваться два образца t-критерия.

Обсуждение

Результаты заявителя устанавливают, как анти-PD-1-PD-L1 biAb влияет на функции CAR-NK, что приводит к разработке нового клеточного терапевтического агента, усиленного CAR и анти-PD-1-PD-L1 biAb, против ОМЛ. Не будучи связанными теорией, этот подход считается комплементарным к сохранению функциональности CAR-NK в

микросреде ОМЛ. Сочетание преимуществ обеих технологий, CAR и biAb, делает biAb более мощным in vivo. Дальнейшие исследования проводят с секретированными анти-PD-1 и анти-PD-L1 по отдельности, т.е. не в виде биспецифического конструкта.

Анти-PD-1-PD-L1 biAb заявителя сочетает в себе технологии CAR и биспецифического антитела, где конститутивно секретированное biAb решает потенциальные проблемы в этой области, такие как короткий период полужизни и дорогостоящее производство и очистка белка. Анти-PD-1-PD-L1 biAb обладает нейтрализующей способностью к контрольным точкам как на эффекторных клетках, так и на клетках-мишенях. Оно является уникальным и первым в отрасли. Ингибиторы контрольных точек обладают системной токсичностью. Напротив, ожидается, что анти-PD-1-PD-L1 biAb будет иметь низкую токсичность, поскольку эффекты антагонизации ограничиваются только раковой клеткой в непосредственной близости от эффекторных клеток. Улучшение функций CAR NK-клеток через антагонизм к PD-1/PD-L1 для клеточной терапии является инновационным и не описано. Это исследование предлагает повышенную устойчивость терапевтических эффектов. Исследования заявителя полезны для других клеточных терапий с использованием NK-клеток. Клеточная экспрессия PD-1-PD-L1 biAb на CAR-NK является новой. Секреторное конструирование PD-1-PD-L1 biAb в векторе экспрессии обеспечивает повсеместную секрецию PD-1-PD-L1 биспецифических антител. Это позволяет избежать проблем с продуцированием белка и проблем с введением биспецифических антител. Это, в свою очередь, значительно увеличивает биодоступность этого малого биспецифического антитела.

ПРИМЕР 2 – PD-1 И PD-L1 АНТИТЕЛА

Подобный успех был продемонстрирован с PD-1 и PD-L1 антителами (*т.е.* не биспецифическими) (**ФИГ. 8А-8В** и **ФИГ. 9**). Вышеописанные исследования повторяют для PD-1 и PD-L1 антител (*т.е.* не биспецифических).

ПРИМЕР 3 – СОВМЕСТНОЕ ВВЕДЕНИЕ FLT3 ИНГИБИТОРА

Дополнительные эксперименты проводят для определения того, повышается ли экспрессия FLT3 при введении ингибитора FLT3. Результаты показаны на **ФИГ. 10** и **ФИГ. 11**. На ФИГ. 10 показано определение поверхностной экспрессии FLT3 в MOLM-13, U937, THP-1, MV4-11 и EOL-1 клеточных линиях ОМЛ, леченных 10 мкМ Мидостаурина, FF-10101, Квизартиниба (AC220) и Довитиниба (TKI-258) ингибиторов FFLT3 в течение 48 часов. Поверхностная экспрессия FLT3 активируется после обработки ингибиторами FLT3. На ФИГ. 11 изображено определение поверхностной экспрессии FLT3 проточной цитометрией и образцах периферической крови пациентов, которых лечили Мидостаурином в течение 48 часов. Поверхностная экспрессия FLT3 активируется после лечения.

Эквиваленты

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой принадлежит данная технология.

Настоящая технология, иллюстративно описанная в настоящем документе, может подходящим образом применяться на практике при отсутствии какого-либо элемента или элементов, ограничения или ограничений, не раскрытых конкретно в настоящем документе. Таким образом, например, термины «содержащий», «включающий», «содержащий» и т. д. следует читать широко и без ограничений. Дополнительно, используемые здесь термины и выражения были использованы в качестве терминов описания и не ограничения, и нет намерения при использовании таких терминов и выражений исключать любые эквиваленты показанных и описанных признаков или их частей, но признается, что в объеме заявленной технологии возможны различные модификации.

Таким образом, следует понимать, что материалы, способы и примеры, представленные здесь, являются типовыми предпочтительными аспектами, являются примерными и не предназначены для ограничения объема настоящей технологии.

Настоящая технология была описана здесь широко и в общих чертах. Каждый из более узких видов и подродовых групп, подпадающих под родовое раскрытие, также образует часть настоящей технологии. Это включает в себя родовое описание настоящей технологии с условием или отрицательным ограничением, исключающим любой объект из рода, независимо от того, упомянут ли исключенный материал здесь конкретно.

Кроме того, если признаки или аспекты настоящей технологии описаны в терминах групп Маркуша, специалисты в данной области техники поймут, что настоящая технология также описывается в терминах любого отдельного члена или подгруппы членов группы Маркуша.

Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылки, упомянутые в настоящем документе, прямо включены в качестве ссылки во всей своей полноте в той же степени, как если бы каждая была отдельно включена в качестве ссылки. В случае противоречия преимущественную силу имеет настоящее описание, включая определения.

Другие аспекты указаны в следующей формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенная нуклеиновая кислота или вектор, содержащий:

a. полинуклеотид, кодирующий химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий: (a) антигенсвязывающий домен FLT3 антитела; (b) шарнирный домен; (c) трансмембранный домен; (d) и внутриклеточный домен; и

b. полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий антигенсвязывающий домен, который распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1.

2. Выделенная нуклеиновая кислота или вектор по п.1, дополнительно содержащий (e)сигнальный домен.

3. Выделенная нуклеиновая кислота или вектор по п.1 или 2, где CAR дополнительно содержит индуцируемый или конститутивно активный элемент.

4. Выделенная нуклеиновая кислота или вектор по п.3, где индуцируемый или конститутивно активный элемент контролирует экспрессию полинуклеотида, кодирующего иммунорегуляторную молекулу или цитокин.

5. Выделенная нуклеиновая кислота или вектор по п.4, где иммунорегуляторная молекула или цитокин содержит один или более из B7.1, CCL19, CCL21, CD40L, CD137L, GITRL, GM-CSF, IL-12, IL-2, низкотоксичный IL-2, IL-15, IL-18, IL-21, LEC и/или OX40L.

6. Выделенная нуклеиновая кислота или вектор по п.4, где иммунорегуляторная молекула или цитокин содержит IL-12 и/или GM-CSF; и/или IL-12 и/или один или более из IL-2 и низкотоксичного IL-2; и/или IL-12 и/или IL-15; и/или IL-12 и/или IL-21; IL-12 и/или B7.1; и/или IL-12 и/или OX40L; и/или IL-12 и/или CD40L; и/или IL-12 и/или GITRL; и/или IL-12 и/или IL-18; и/или один или более из IL-2 и низкотоксичного IL-2 и один или более из CCL19, CCL21 и LEC; и/или IL-15 и один или более из CCL19, CCL21 и LEC; и/или IL-21 и один или более из CCL19, CCL21 и LEC; и/или GM-CSF и один или более из CCL19, CCL21 и LEC; и/или OX40L и один или более из CCL19, CCL21 и LEC; и/или CD137L и один или более из CCL19, CCL21 и LEC; и/или содержит B7.1 и один или более из CCL19, CCL21 и LEC; и/или CD40L и один или более из CCL19, CCL21 и LEC; и/или GITRL и один или более из CCL19, CCL21 и LEC.

7. Выделенная нуклеиновая кислота или вектор по любому из пп. 1-6, где шарнирный домен содержит CD8 α шарнирный домен.

8. Выделенная нуклеиновая кислота или вектор по любому из пп. 1-7, где трансмембранный домен содержит CD8α трансмембранный домен.

9. Выделенная нуклеиновая кислота или вектор по любому из пп. 1-8, где костимулирующая сигнальная область содержит CD28 костимулирующую сигнальную область и/или 4-1BB костимулирующую сигнальную область.

10. Выделенная нуклеиновая кислота или вектор по п.1, где CAR сдержит: (a) антигенсвязывающий домен FLT3 антитела; (b) CD8 α шарнирный домен; (c) CD8 α трансмембранный домен; и (d) CD28 костимулирующую сигнальную область и/или 4-1BB костимулирующую сигнальную область.

11. Выделенная нуклеиновая кислота или вектор по п.2, где CAR содержит: (a) антигенсвязывающий домен FLT3 антитела; (b) CD8 α шарнирный домен; (c) CD8 α трансмембранный домен; (d) CD28 костимулирующую сигнальную область и/или 4-1BB костимулирующую сигнальную область; и (e) CD3 дзета сигнальный домен.

12. Выделенная нуклеиновая кислота или вектор по любому из пп. 1-11, где антигенсвязывающий домен FLT3 антитела содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

CDHR1, имеющую аминокислотную последовательность (SYWMH) или (NYGLH) или эквивалент каждой из них,

CDHR2, имеющую аминокислотную последовательность (EIDPSDSYKDYNQKFKD) или (VIWSGGSTDYNAAFIS) или эквивалент каждой из них, и

CDHR3, имеющую аминокислотную последовательность (AITTTPFDF) или (GGIYYANHYYAMDY) или эквивалент каждой из них, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую:

CDLR1, имеющую аминокислотную последовательность (RASQSISNNLH) или (KSSQSLLNSGNQKNYM) или эквивалент каждой из них,

CDLR2, имеющую аминокислотную последовательность (YASQSIS) или (GASTRES) или эквивалент каждой из них, и

CDLR3, имеющую аминокислотную последовательность (QQSNTWPYT) или (QNDHSYPLT) или эквивалент каждой из них.

13. Выделенная нуклеиновая кислота или вектор по любому из пп. 1-12, где антигенсвязывающий домен, который распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1, содержит PD-1 антагонист и/или PD-L1 антагонист, и/или эквивалент каждого из них.

14. Выделенная нуклеиновая кислота или вектор по любому из пп. 1-12, где антигенсвязывающий домен или его антигенсвязывающий фрагмент, который распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1, содержит CDR области антитела к PD-1 и/или PD-L1, и/или эквивалент каждого из них.

15. Выделенная нуклеиновая кислота или вектор по п.14, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1, содержит вариабельную область тяжелой цепи и легкой цепи антитела к PD-1 и/или PD-L1, и/или эквивалент каждого из них.

16. Выделенная нуклеиновая кислота или вектор по п.14 или 15, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1, содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий антигенсвязывающий домен PD-1 антитела и/или одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий антигенсвязывающий домен PD-L1 антитела, и/или эквивалент каждого из них.

17. Выделенная нуклеиновая кислота или вектор по любому из пп. 1-16, где антителом, которое распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1, является биспецифическое

антитело.

18. Выделенная нуклеиновая кислота или вектор по п.17, где их биспецифическое антитело содержит PD-1 антагонист и PD-L1 антагонист и, необязательно, дополнительно содержит линкер.

19. Выделенная нуклеиновая кислота или вектор по п.17, где их биспецифическое антитело содержит CDR области антитела к PD-1 и PD-L1, и, необязательно, дополнительно содержит линкер.

20. Выделенная нуклеиновая кислота или вектор по п.19, где биспецифическое антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи и легкой цепи антитела к PD-1 и PD-L1 и, необязательно, дополнительно содержит линкер.

21. Выделенная нуклеиновая кислота или вектор по п.20, где биспецифическое антитело содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий антигенсвязывающий домен PD-1 антитела и одноцепочечный фрагмент (scFv), содержащий антигенсвязывающий домен PD-L1 антитела, и, необязательно, дополнительно содержит линкер.

22. Выделенная нуклеиновая кислота или вектор по любому из пп. 1-21, где вектором является плазмида.

23. Выделенная нуклеиновая кислота или вектор по любому из пп. 1-21, где вектором является вирусный вектор, выбранный из ретровирусного вектора, лентивирусного вектора, аденовирусного вектора или аденоассоциированного вирусного вектора.

24. Выделенная нуклеиновая кислота или вектор по любому из пп. 1-21, где вектор является бицистронным.

25. Выделенная нуклеиновая кислота или вектор по любому из пп. 1-24, дополнительно содержащий промотор и/или энхансер, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который распознает и связывает PD-1 и/или PD-L1.

26. Выделенная клетка, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту или вектор по любому из пп. 1-25.

27. Выделенная клетка по п.26, где клеткой является прокариотическая клетка.

28. Выделенная клетка по п.26, где клеткой является эукариотическая клетка.

29. Выделенная клетка по п.28, где эукариотическая клетка выбрана из клетки животного, клетки млекопитающего, клетки крупного рогатого скота, клетки кошки, клетки собаки, клетки мыши, клетки лошади или клетки человека.

30. Выделенная клетка по п.28 или 29, где эукариотическая клетка представляет собой иммунную клетку, необязательно, Т-клетку, В-клетку, NK-клетку, дендритную клетку, миелоидную клетку, моноцит или макрофаг.

31. Выделенная клетка по любому из пп. 26-30, где выделенная клетка экспрессирует CAR и секретирует антитело, необязательно, биспецифическое антитело.

32. Выделенная клетка по любому из пп. 26-31, где клетка была активирована.

33. Увеличенная популяция клеток по любому из пп. 26-32.

34. По существу гомогенная популяция клеток по п.33.

35. Антитело, содержащее последовательность одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), содержащую аминокислотную последовательность (QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNG GTNFNEKFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQG TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPAT FGQGTKVEIKR) или ее эквивалент.

36. Антитело, содержащее последовательность одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), содержащую аминокислотную последовательность (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKG LEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHW PGGFDYWGQGTLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASK GVSTSGYSYLHWYQQKPGEAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIK) или ее эквивалент.

37. Антитело, содержащее последовательность одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), кодируемую нуклеотидной последовательностью, содержащей последовательность нуклеиновых кислот (CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGCGTTA AAGTTTCTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGGGTAC GGCAGGCTCCAGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAACGGC GGCACTAACTTTAACGAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAACTGACTCAAG TACGACTACAGCATACATGGAACTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTGTCTA TTATTGCGCGAGAAGAGACTATCGCTTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGCAAGG TACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGGTGGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTCAGGTG GAGGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCCCCAAGCTCTCTGTCCGCGTCAGTGG GCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAGATGTGTCAACCGCTGTCGCCT GGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCCTAAGCTTCTCATCTACTCAGCTTCTTTTC TGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGGACGGACTTCACAT TGACCATAAGTTCCTTGCAGCCTGAGGATTTCGCTACATATTATTGCCAACAGTACC TTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG) или ее эквивалент.

38. Антитело, содержащее последовательность одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), кодируемую нуклеотидной последовательностью: (GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCACTCCG GTTGTCCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGTGCGC CAAGCCCCGGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGGGTTC CACCTACTATGCTGATTCAGTAAAAGGACGGTTCACTATAAGCGCGGATACAAGTA AGAATACTGCCTATCTTCAAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTATATT

ATTGCGCTAGACGACATTGGCCAGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTTG
TGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGGCAGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGTGGT
TCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCCACATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAGAGA
GCAACTCTGTCATGCCGGGCGTCAAAAGGTGTCAGTACGTCAGGCTACTCCTATCTT
CATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCTTCTCATATACCTGGCTAGT
TACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGGTCTGGGACTGATTTT
ACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACTATTGCCAACAT
TCACGCGATTTGCCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTTGAAATAAAA) или ее эквивалентом.

39. Биспецифическое антитело, содержащее последовательность одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), содержащую аминокислотную последовательность: S (QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASG
YTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTTDSSTTTAYMEL
KSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMT
QSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR) и/или (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGST
YYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVT
VSAGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQ
QKPGEAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTF
GGGTKVEIK) или эквивалент каждой из них.

40. Биспецифическое антитело, содержащее последовательность одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), кодируемую нуклеотидной последовательностью, содержащей последовательность нуклеиновых кислот: (CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGCGTTA
AAGTTTCTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGGGTAC
GGCAGGCTCCAGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAACGGC
GGCACTAACTTTAACGAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAACTGACTCAAG
TACGACTACAGCATACATGGAACTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTGTCTA
TTATTGCGCGAGAAGAGACTATCGCTTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGCAAGG
TACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGGTGGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTCAGGTG
GAGGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCCCCAAGCTCTCTGTCCGCGTCAGTGG
GCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAGATGTGTCAACCGCTGTCGCCT
GGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCCTAAGCTTCTCATCTACTCAGCTTCTTTTC
TGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGGACGGACTTCACAT
TGACCATAAGTTCCTTGCAGCCTGAGGATTTCGCTACATATTATTGCCAACAGTACC
TTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG) и/или (GAAGTTCAG
TTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCACTCCGGTTGTCCTGT
GCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGTGCGCCAAGCCCCG

GGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGGGTTCCACCTACTAT
GCTGATTCAGTAAAAGGACGGTTCACTATAAGCGCGGATACAAGTAAGAATACTGC
CTATCTTCAAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTATATTATTGCGCTAG
ACGACATTGGCCAGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTTGTGACCGTTAG
TGCGGGAGGTGGTGGCAGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGTGGTTCAGAAATTG
TCCTGACTCAATCCCCTGCCACATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAGAGAGCAACTCTGT
CATGCCGGGCGTCAAAAGGTGTCAGTACGTCAGGCTACTCCTATCTTCATTGGTATC
AGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCTTCTCATATACCTGGCTAGTTACCTTGAG
AGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGGTCTGGGACTGATTTTACGCTGACA
ATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACTATTGCCAACATTCACGCGAT
TTGCCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTTGAAATAAAA) или их эквивалент.

41. Антитело по любому из пп. 35-40, где антителом является IgA, IgD, IgE, IgG или IgM антитело.

42. Антитело по любому из пп. 35-41, где антитело содержит константную область.

43. Антитело по п.42, где константная область содержит IgA, IgD, IgE, IgG или IgM константную область.

44. Антитело по п.42 или 43, где константной областью является IgG1 константная область или Ig каппа константная область.

45. Антитело, которое конкурирует для связывания с антителом по любому из пп. 35-44.

46. Антитело по любому из пп. 35-45, где антителом является поликлональное, моноклональное или гуманизированное антитело.

47. Антигенсвязывающий фрагмент антитела по любому из пп. 35-46.

48. Антигенсвязывающий фрагмент по п.47, где антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из Fab, F(ab')2, Fab', scFv и Fv.

49. Антигенсвязывающий фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность: (QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPG
QGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRD
YRFDMGFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
RASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF
ATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR) или эквивалент каждой из них.

50. Антигенсвязывающий фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность: (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPG
KGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARR
HWPGGFDYWGQGTLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR
ASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGEAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPE
DFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIK) или эквивалент каждой из них.

51. Антигенсвязывающий фрагмент, кодируемый нуклеотидной последовательностью, содержащей последовательность нуклеиновых кислот: (CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGCGTTA

AAGTTTCTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGGGTAC
GGCAGGCTCCAGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAACGGC
GGCACTAACTTTAACGAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAACTGACTCAAG
TACGACTACAGCATACATGGAACTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTGTCTA
TTATTGCGCGAGAAGAGACTATCGCTTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGCAAGG
TACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGGTGGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTCAGGTG
GAGGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCCCCAAGCTCTCTGTCCGCGTCAGTGG
GCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAGATGTGTCAACCGCTGTCGCCT
GGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCCTAAGCTTCTCATCTACTCAGCTTCTTTTC
TGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGGACGGACTTCACAT
TGACCATAAGTTCCTTGCAGCCTGAGGATTTCGCTACATATTATTGCCAACAGTACC
TTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG) или эквивалент каждой из них.

52. Антигенсвязывающий фрагмент, кодируемый нуклеотидной последовательностью, содержащей последовательность нуклеиновых кислот:(GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCA
CTCCGGTTGTCCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGG
TGCGCCAAGCCCCGGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGG
GGTTCCACCTACTATGCTGATTCAGTAAAAGGACGGTTCACTATAAGCGCGGATACA
AGTAAGAATACTGCCTATCTTCAAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTA
TATTATTGCGCTAGACGACATTGGCCAGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACT
CTTGTGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGGCAGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGG
TGGTTCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCCACATTGAGTTTGAGCCCAGGAGA
GAGAGCAACTCTGTCATGCCGGGCGTCAAAAGGTGTCAGTACGTCAGGCTACTCCT
ATCTTCATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCTTCTCATATACCTGG
CTAGTTACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGGTCTGGGACTG
ATTTTACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACTATTGCC
AACATTCACGCGATTTGCCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTTGAAATAAAA) или эквивалент каждой из них.

53. Полипептид, содержащий аминокислотную последовательность: или 47 45 (QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYY
MYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFDD
TAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLS
ASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDF
TLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR) или (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQ
APGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RRHWPGGFDYWGQGTLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLS
CRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGEAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSL
EPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIK) или эквивалент каждой из них.

54. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновых кислот: (CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGC
GTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGCGTTAAAGTTTCTTGCAAGGCTTCAGGATA
TACTTTCACTAACTACTATATGTACTGGGTACGGCAGGCTCCAGGGCAAGGGTTGGA
GTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAACGGCGGCACTAACTTTAACGAAAAATTTA
AAAATAGGGTGACCCTCACAACTGACTCAAGTACGACTACAGCATACATGGAACTC
AAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTGTCTATTATTGCGCGAGAAGAGACTATCGC
TTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGCAAGGTACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGG
GGTGGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTCAGGTGGAGGAGGGTCTGACATTCAGATGAC
GCAATCCCCAAGCTCTCTGTCCGCGTCAGTGGGCGACCGAGTTACAATCACATGCCG
CGCTTCTCAAGATGTGTCAACCGCTGTCGCCTGGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGG
CCCCTAAGCTTCTCATCTACTCAGCTTCTTTTCTGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATT
CTCAGGATCCGGTAGTGGGACGGACTTCACATTGACCATAAGTTCCTTGCAGCCTGA
GGATTTCGCTACATATTATTGCCAACAGTACCTTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAG
GGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG) или
(GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCACTCCG
GTTGTCCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGTGCGC
CAAGCCCCGGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGGGTTC
CACCTACTATGCTGATTCAGTAAAAGGACGGTTCACTATAAGCGCGGATACAAGTA
AGAATACTGCCTATCTTCAAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTATATT
ATTGCGCTAGACGACATTGGCCAGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTTG
TGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGGCAGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGTGGT
TCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCCACATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAGAGA
GCAACTCTGTCATGCCGGGCGTCAAAAGGTGTCAGTACGTCAGGCTACTCCTATCTT
CATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCTTCTCATATACCTGGCTAGT
TACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGGTCTGGGACTGATTTT
ACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACTATTGCCAACAT
TCACGCGATTTGCCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTTGAAATAAAA) или
эквивалент каждой из них.

55. Композиция, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту или вектор по любому из пп. 1-25 или 54, антитело по любому из пп. 35-46, антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 47-52, полипептид по п.53, выделенную клетку по любому из пп. 26-32 и/или популяцию клеток по п.33 или 34, и, необязательно, фармацевтически приемлемый носитель.

56. Композиция по п.55, дополнительно содержащая эффективное количество ингибитора FLT3, необязательно выбранного из группы, состоящей из квизаритиниба, мидостаурина, FF-10101 и довитиниба.

57. Выделенный комплекс, содержащий выделенную клетку по любому из пп. 26–32, связанную с клеткой, экспрессирующей FLT3 и/или PD-1 и/или PD-L1 и/или его фрагментом.

58. Выделенный комплекс, содержащий выделенную клетку по любому из пп. 26–32, связанную с FLT3 и/или PD-1 и/или PD-L1 и/или его фрагментом.

59. Способ получения CAR экспрессирующей клетки, включающий трансдукцию выделенной клетки с выделенной нуклеиновой кислотой или вектором по любому из пп. 1-25.

60. Способ по п.59, где выделенные клетки выбирают из группы, состоящей из Т-клетки, В-клетки, NK-клетки, дендритной клетки, миелоидной клетки, моноцита или макрофага.

61. Способ ингибирования роста рака или опухоли, экспрессирующей FLT3, необязательно, острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), у субъекта, включающий контакт рака или опухоли с выделенной клеткой по любому из пп. 26-32 или композицией по п.55 или 56.

62. Способ ингибирования роста рака или опухоли, экспрессирующей FLT3, у субъекта, необязательно, острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), включающий измерение экспрессии PD-1 и/или PD-L1 у субъекта и введение выделенной клетки по любому из пп. 26-32, антитела по любому из пп. 35-46, антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 47-52 и/или композиции по п.55 или 56 субъекту, экспрессирующему PD-1 и/или PD-L1.

63. Способ ингибирования роста рака или опухоли у субъекта, необязательно, острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), включающий измерение экспрессии PD-1 и/или PD-L1 у субъекта и введение антитела по любому из пп. 35-46, антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 47-52 и/или композиции по п.55 или 56 субъекту, экспрессирующему PD-1 и/или PD-L1.

64. Способ по п.61, где контакт происходит in vitro или in vivo.

65. Способ по п.64, где контакт происходит in vivo и выделенные клетки являются аутологичными для субъекта, получающего лечение.

66. Способ по п.65, где контакт происходит in vivo и выделенные клетки являются аллогенными для субъекта, получающего лечение.

67. Способ по любому из пп. 61-66, дополнительно включающий введение субъекту эффективного количества циторедуктивной терапии.

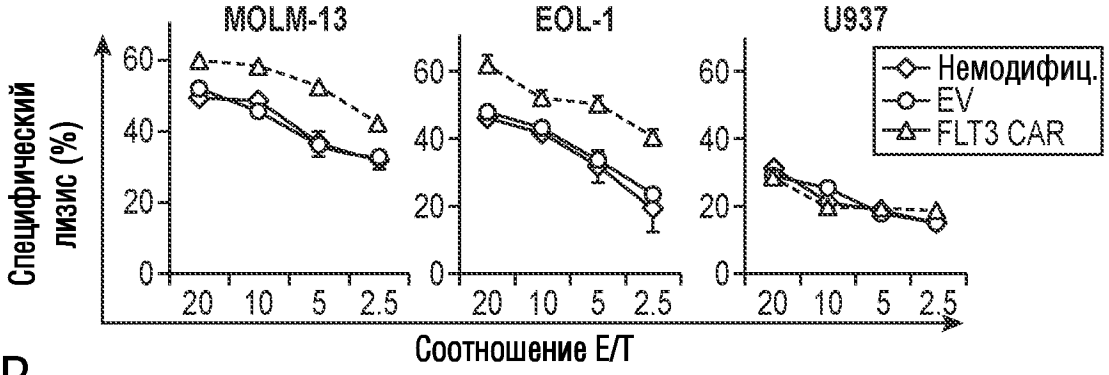
68. Способ по п.67, где циторедуктивная терапия включает химиотерапию, криотерапию, гипертермию, таргетную терапию и/или радиационную терапию.

69. Способ по любому из пп. 61-68, где субъектом является пациент-человек.

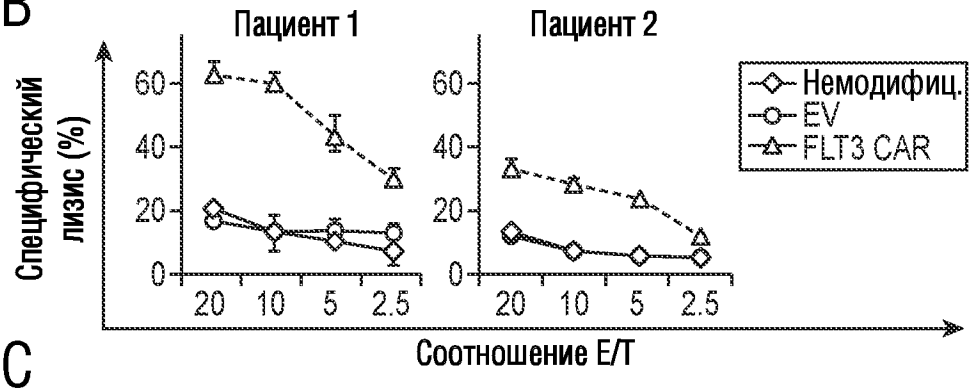
70. Набор, содержащий композицию, раскрытую в настоящей заявке, и, необязательно, инструкции по применению.

ФИГ.1

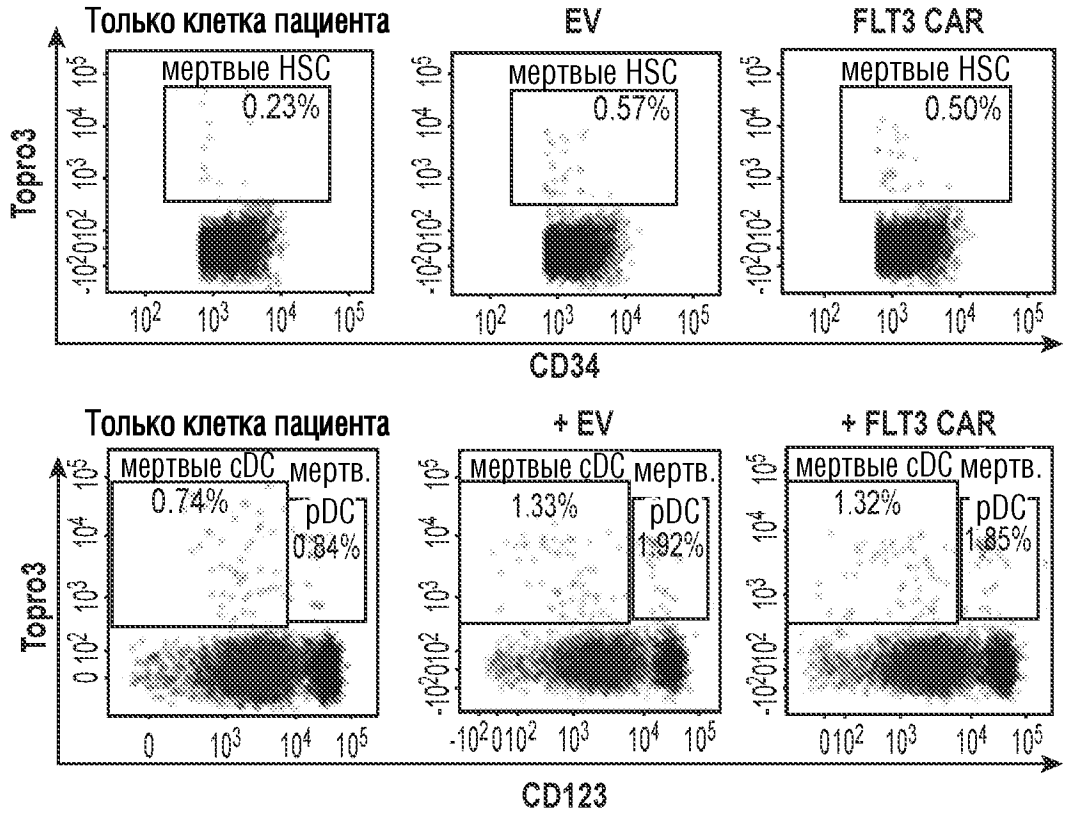
ФИГ.2А



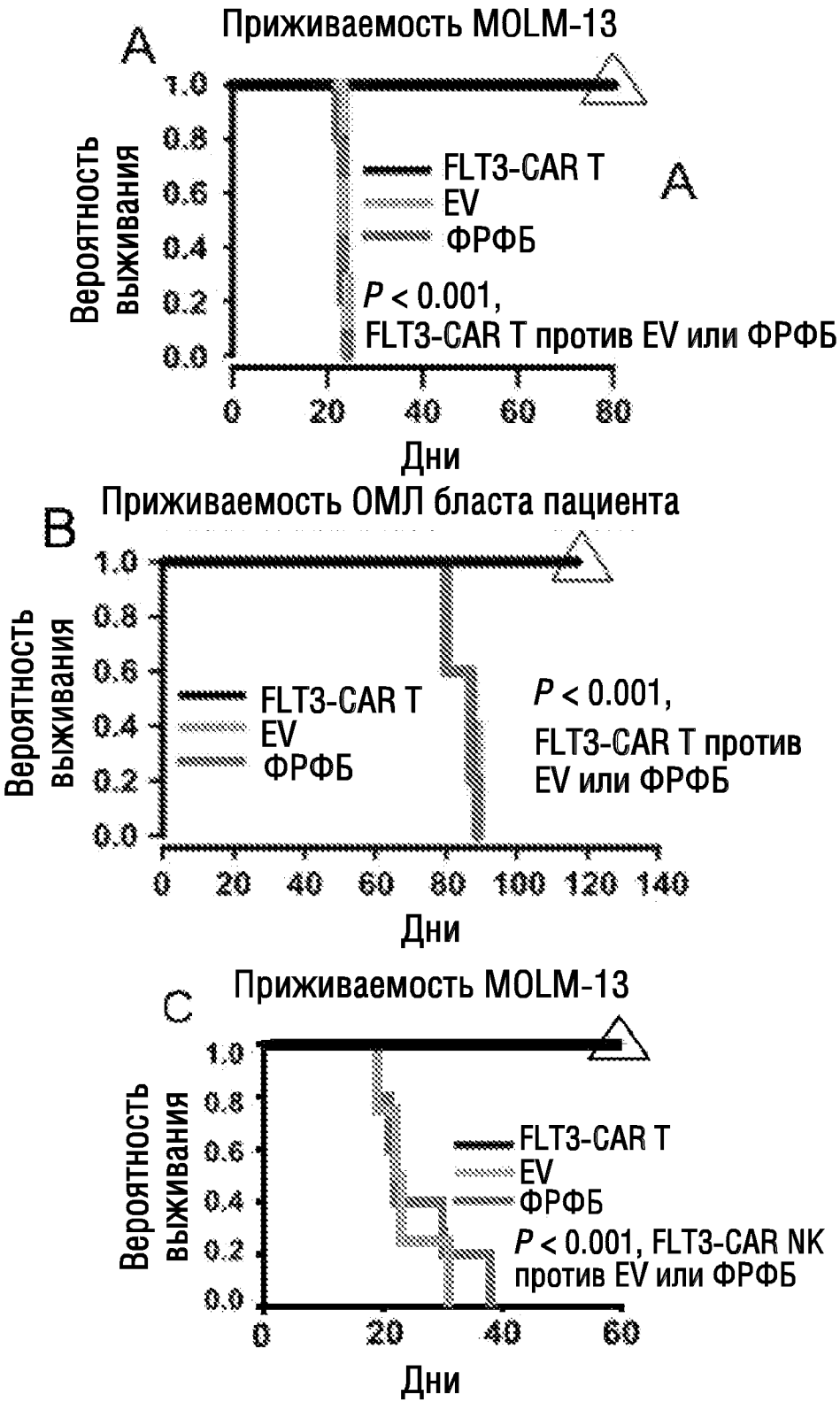
ФИГ.2В



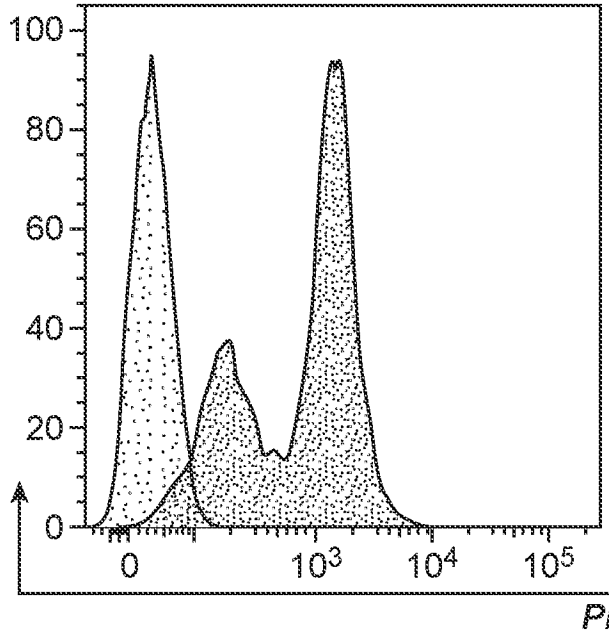
ФИГ.2С



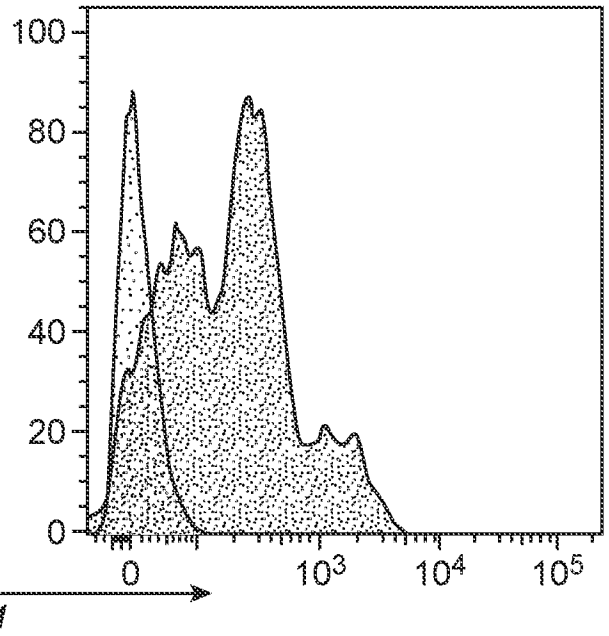
ФИГ.3A-3C


A
Приживаемость MOLM-13
Вероятность выживания
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
FLT3-CAR T
EV
ФРФБ
A
P < 0.001,
FLT3-CAR T против EV или ФРФБ
0
20
40
60
80
Дни
B
Приживаемость ОМЛ бласта пациента
Вероятность выживания
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
FLT3-CAR T
EV
ФРФБ
P < 0.001,
FLT3-CAR T против EV или ФРФБ
0
20
40
60
80
100
120
140
Дни
C
Приживаемость MOLM-13
Вероятность выживания
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
FLT3-CAR T
EV
ФРФБ
P < 0.001, FLT3-CAR NK
против EV или ФРФБ
0
20
40
60
Дни

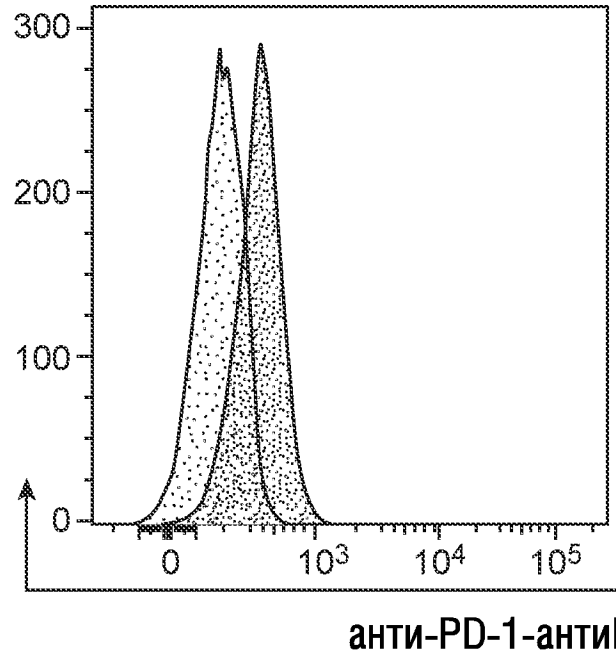
ФИГ.4A



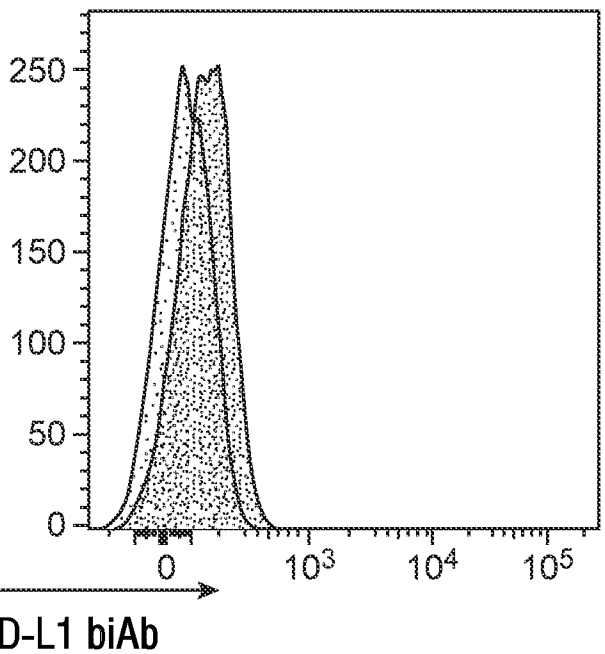
ФИГ.4B



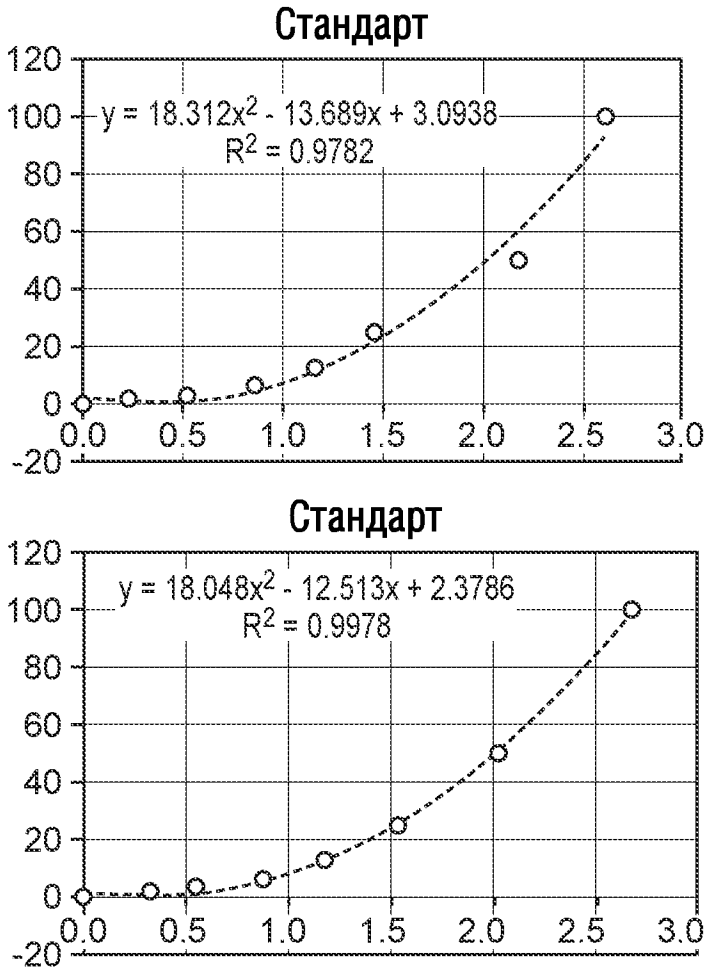
ФИГ.4C



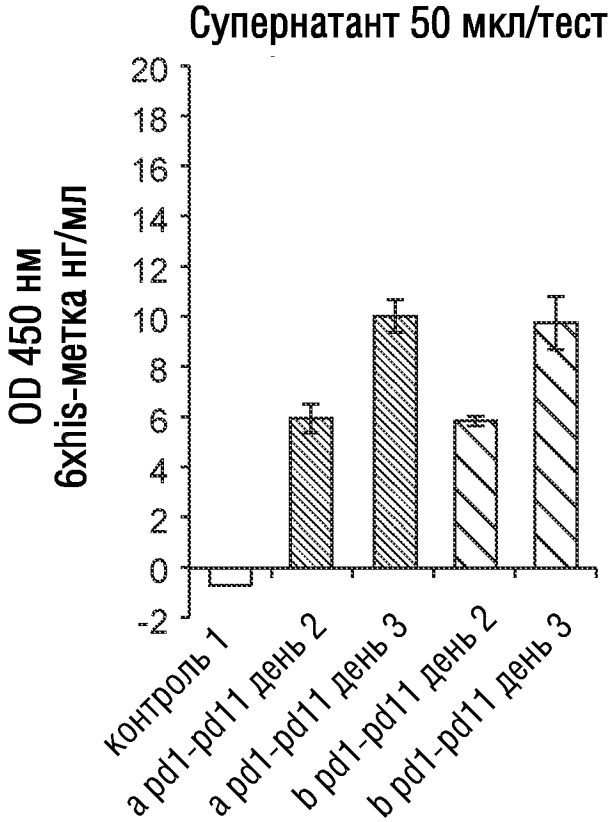
ФИГ.4D



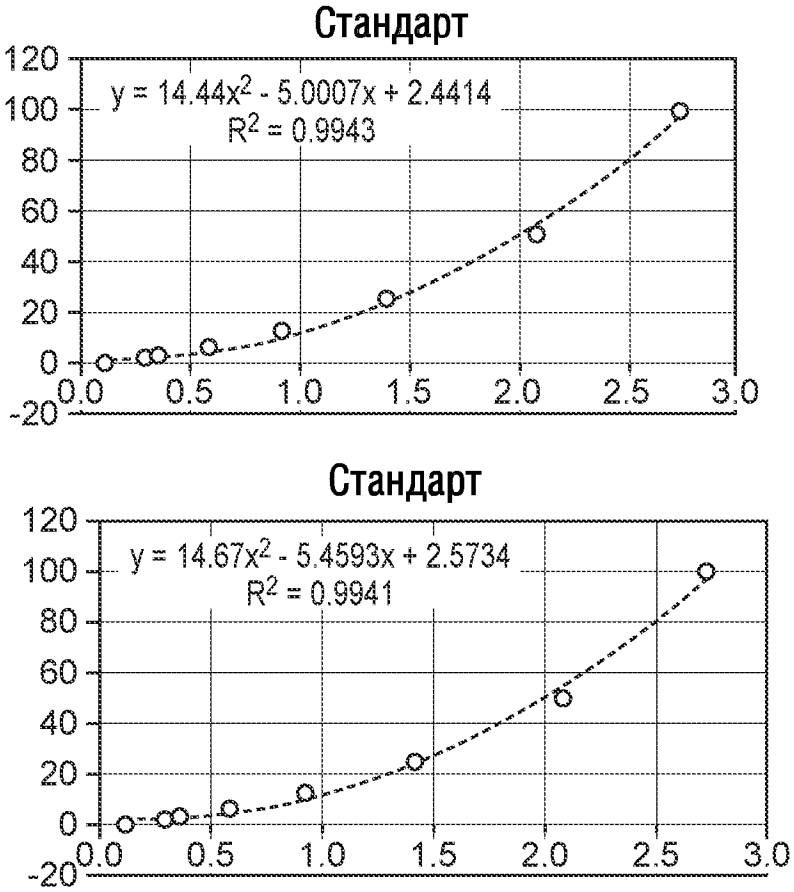
ФИГ.5А


Стандарт
y = 18.312x2 - 13.689x + 3.0938
R2 = 0.9782
120
100
80
60
40
20
0
-20
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
Стандарт
y = 18.048x2 - 12.513x + 2.3786
R2 = 0.9978
120
100
80
60
40
20
0
-20
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0

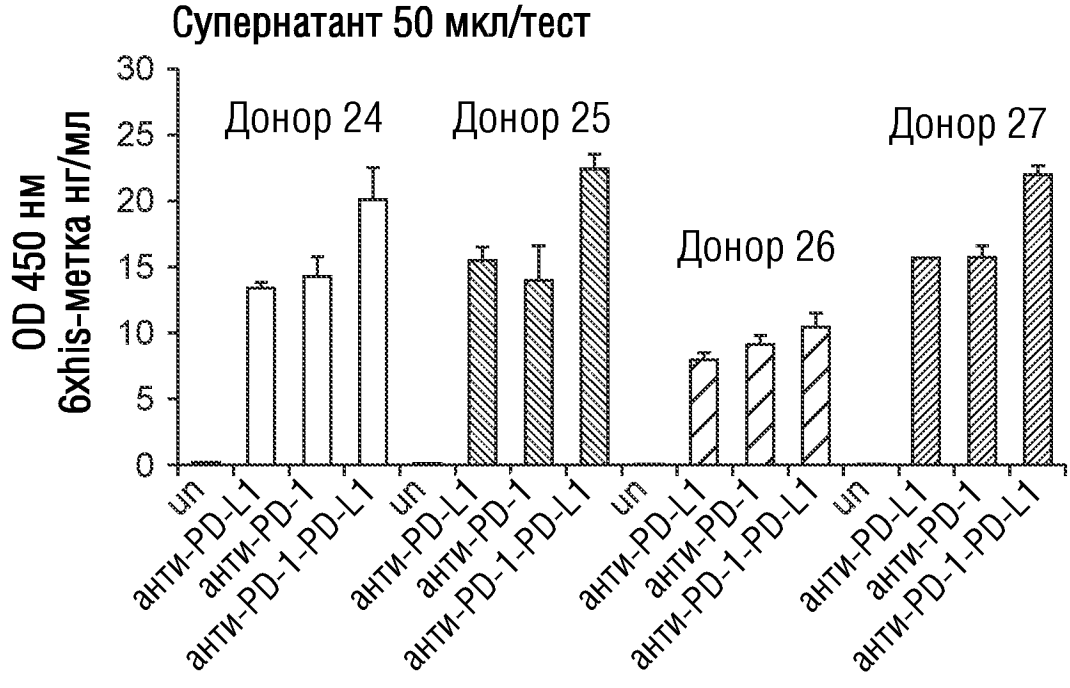
ФИГ.5В


Супернатант 50 мкл/тест
OD 450 нм
6xhis-метка нг/мл
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
-2
контроль 1
a pd1-pd11 день 2
a pd1-pd11 день 3
b pd1-pd11 день 2
b pd1-pd11 день 3

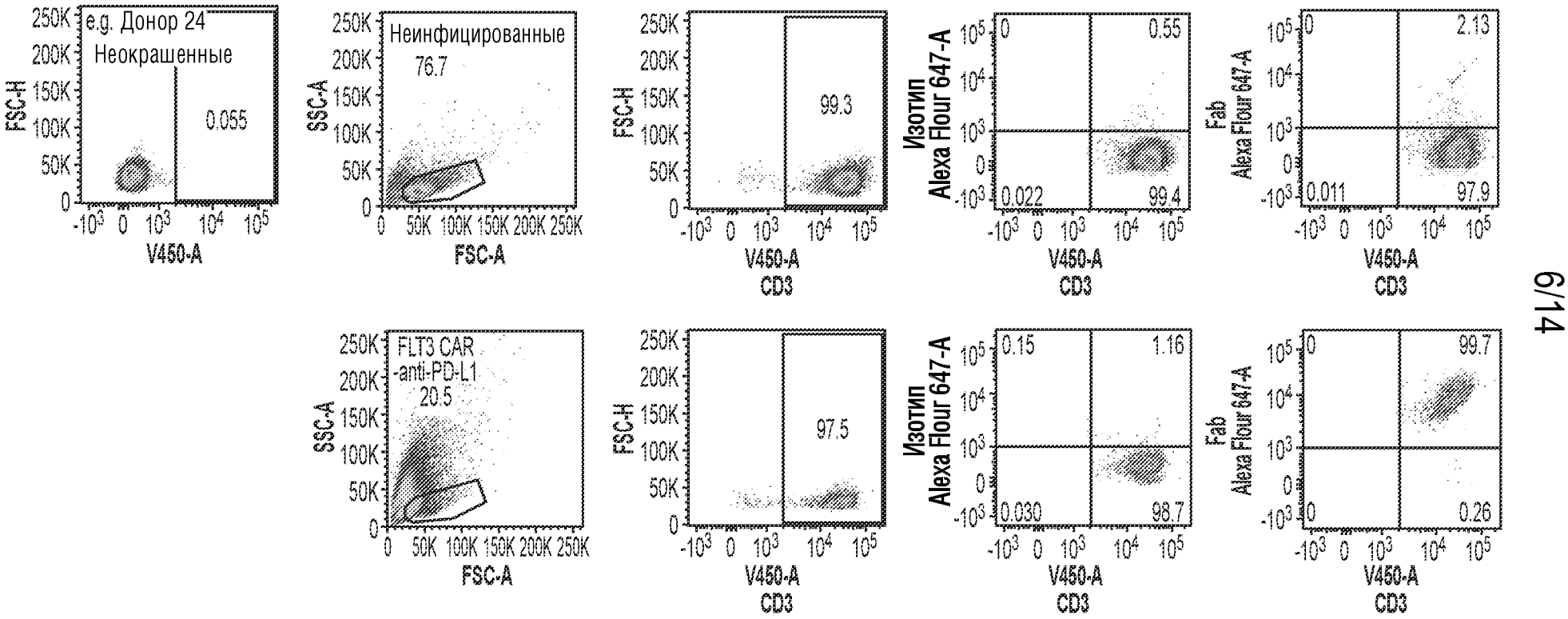
ФИГ.6А


Стандарт
y = 14.44x2 - 5.0007x + 2.4414
R2 = 0.9943
120
100
80
60
40
20
0
-20
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
Стандарт
y = 14.67x2 - 5.4593x + 2.5734
R2 = 0.9941
120
100
80
60
40
20
0
-20
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0

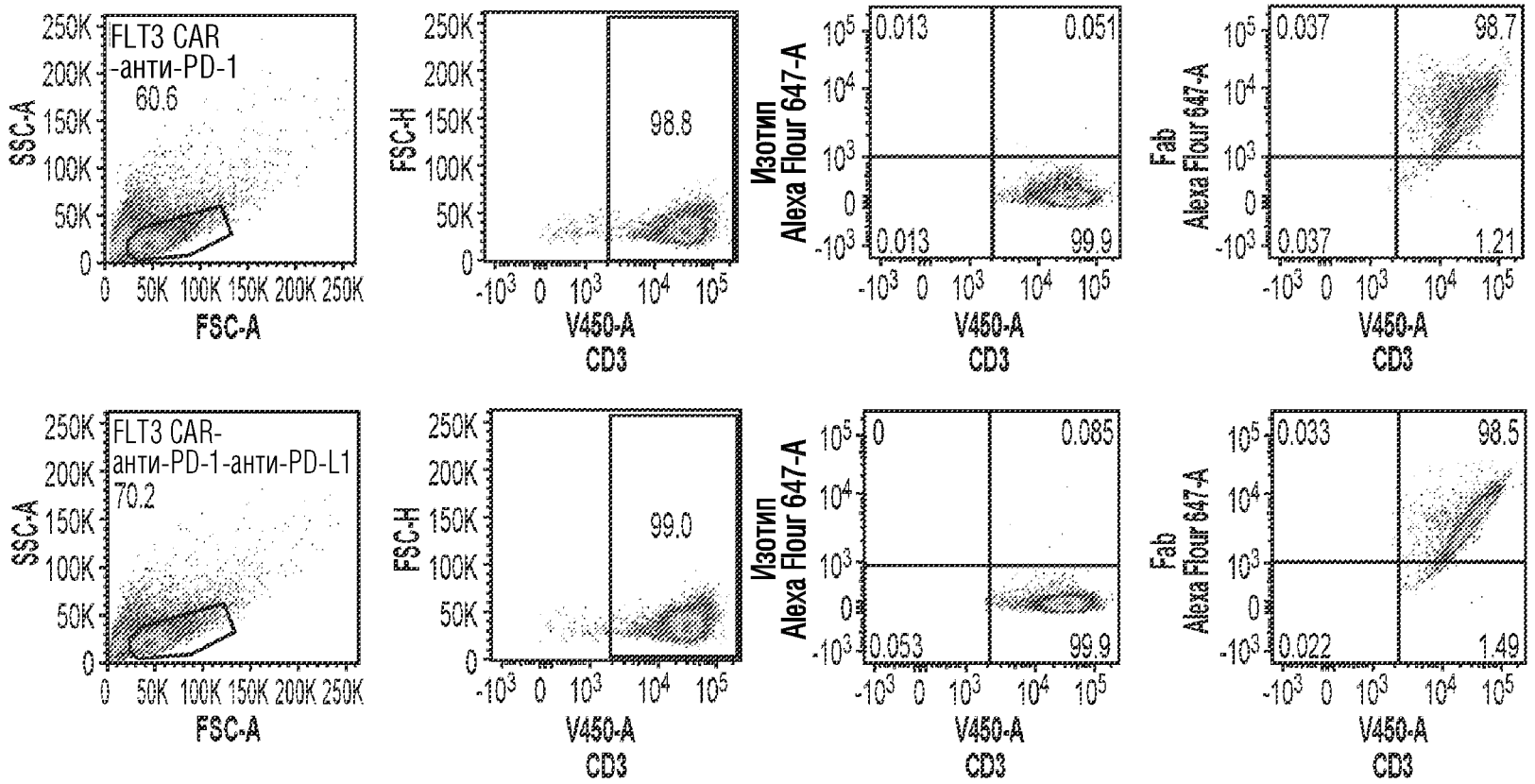
ФИГ.6В


Супернатант 50 мкл/тест
OD 450 нм
6xhis-метка нг/мл
30
25
20
15
10
5
0
Донор 24
Донор 25
Донор 26
Донор 27
un
анти-PD-L1
анти-PD-1
анти-PD-1-PD-L1

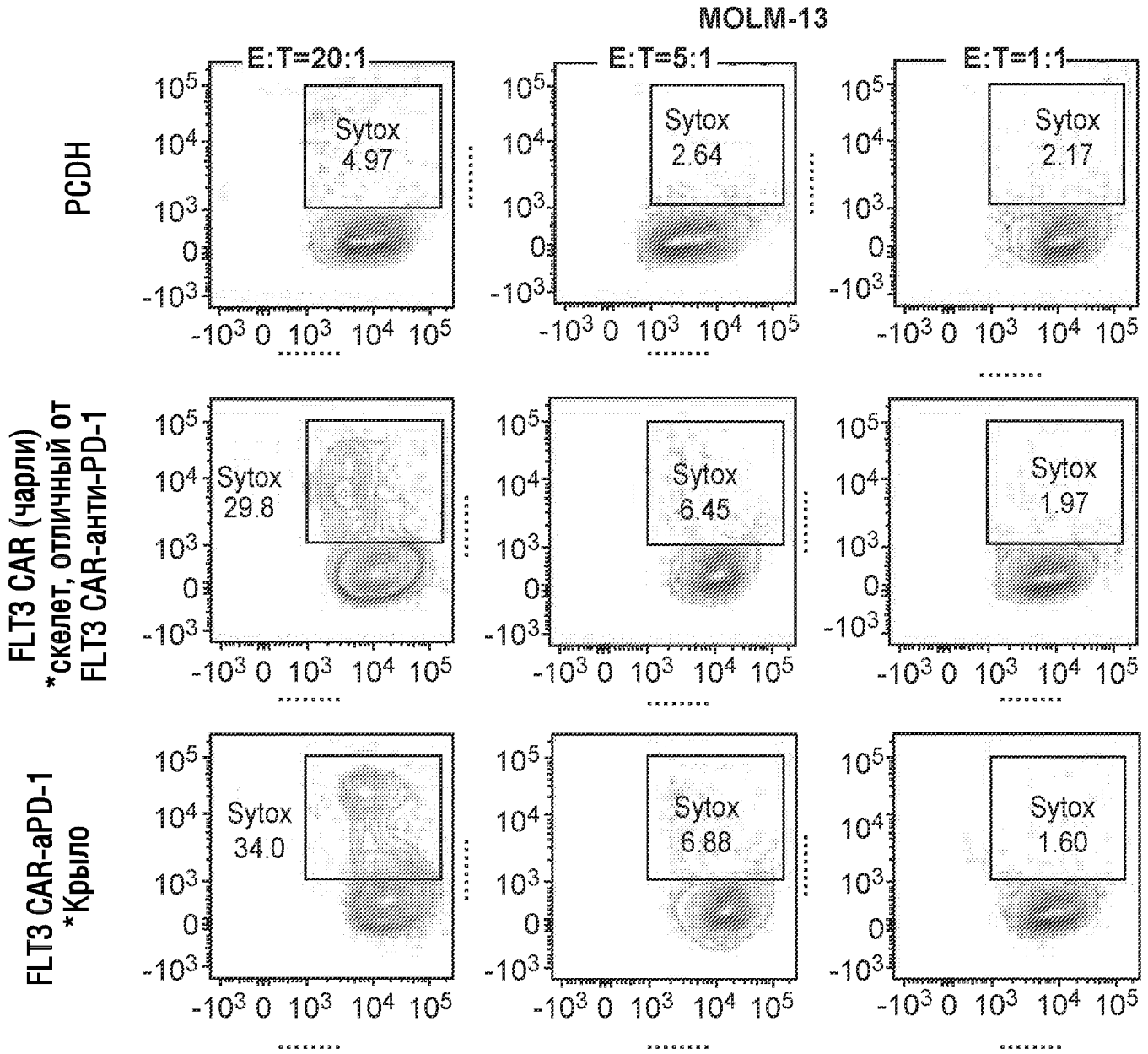
ФИГ.7


e.g. Донор 24
Неокрашенные
0.055
FSC-H
V450-A
Неинфицированные
76.7
SSC-A
FSC-A
99.3
CD3
Изотип
Alexa Flour 647-A
0
0.55
0.022
99.4
Fab
2.13
0.011
97.9
FLT3 CAR
-anti-PD-L1
20.5
97.5
0.15
1.16
0.030
98.7
99.7
0.26

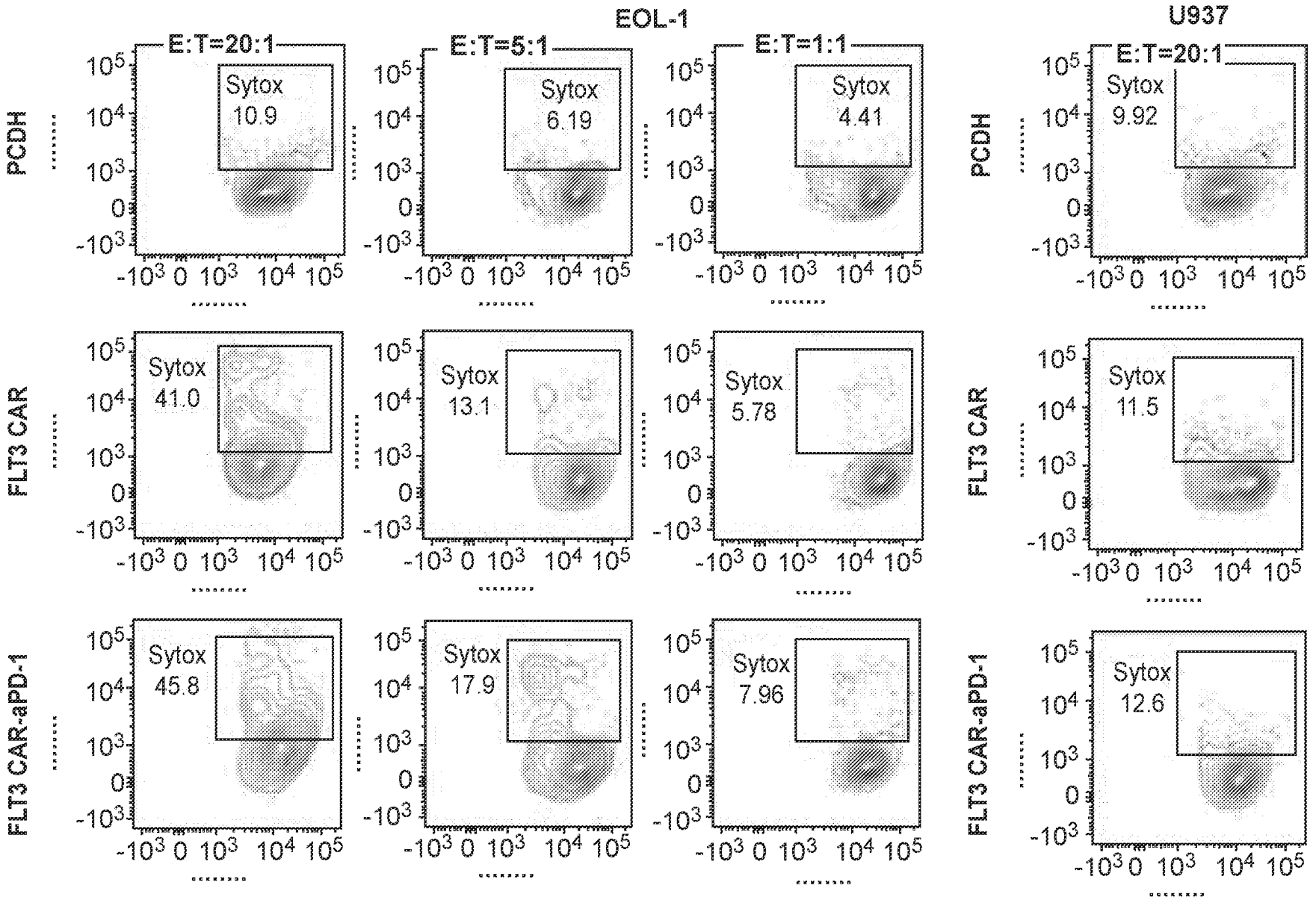
ФИГ.7 (продолжение)



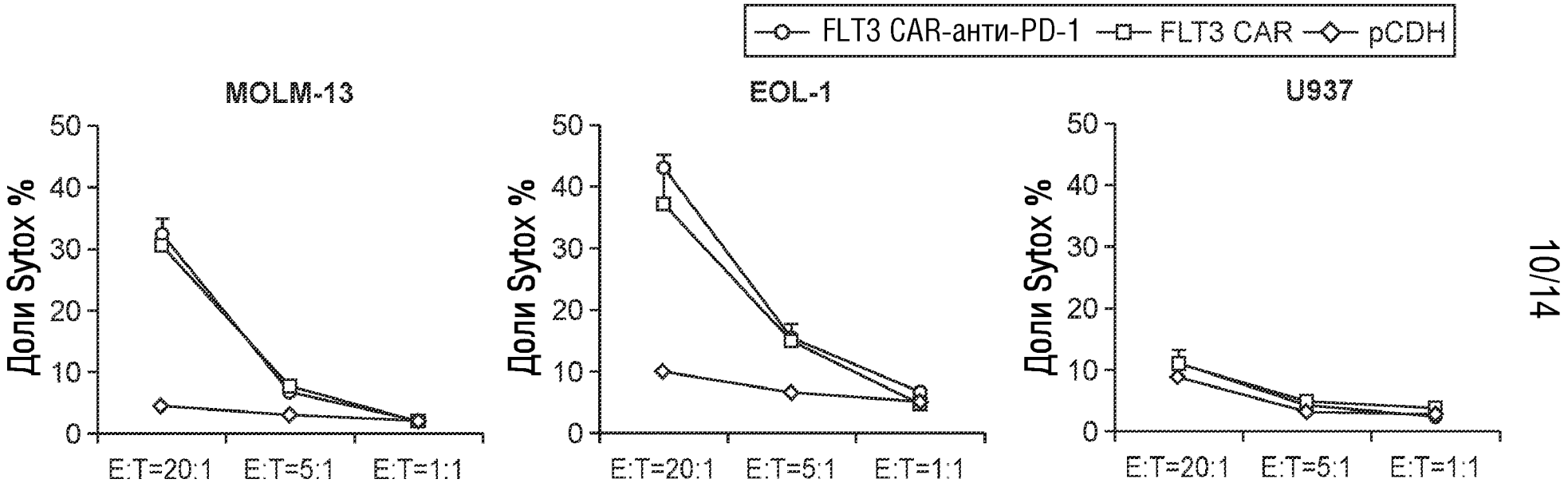
ФИГ.8А


MOLM-13
E:T=20:1
E:T=5:1
E:T=1:1
PCDH
FLT3 CAR (чарли)
*скелет, отличный от
FLT3 CAR-анти-PD-1
FLT3 CAR-aPD-1
*Крыло
Sytox
4.97
Sytox
2.64
Sytox
2.17
Sytox
29.8
Sytox
6.45
Sytox
1.97
Sytox
34.0
Sytox
6.88
Sytox
1.60

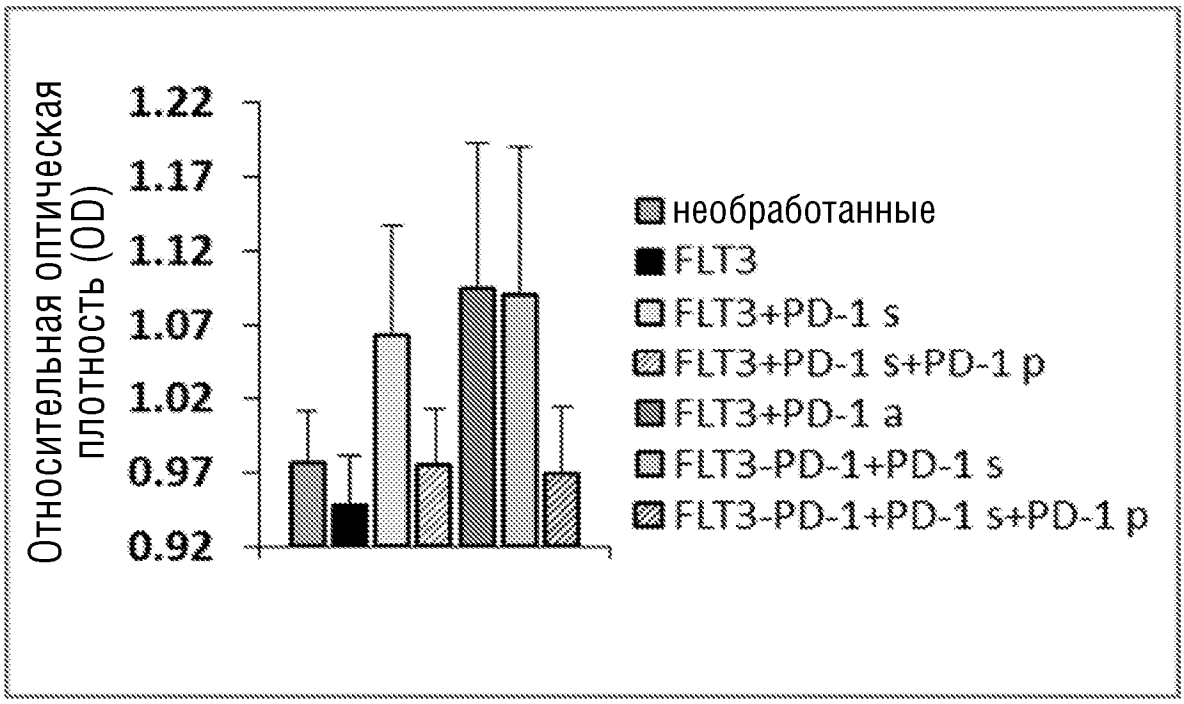
ФИГ.8А (продолжение)



ФИГ.8В

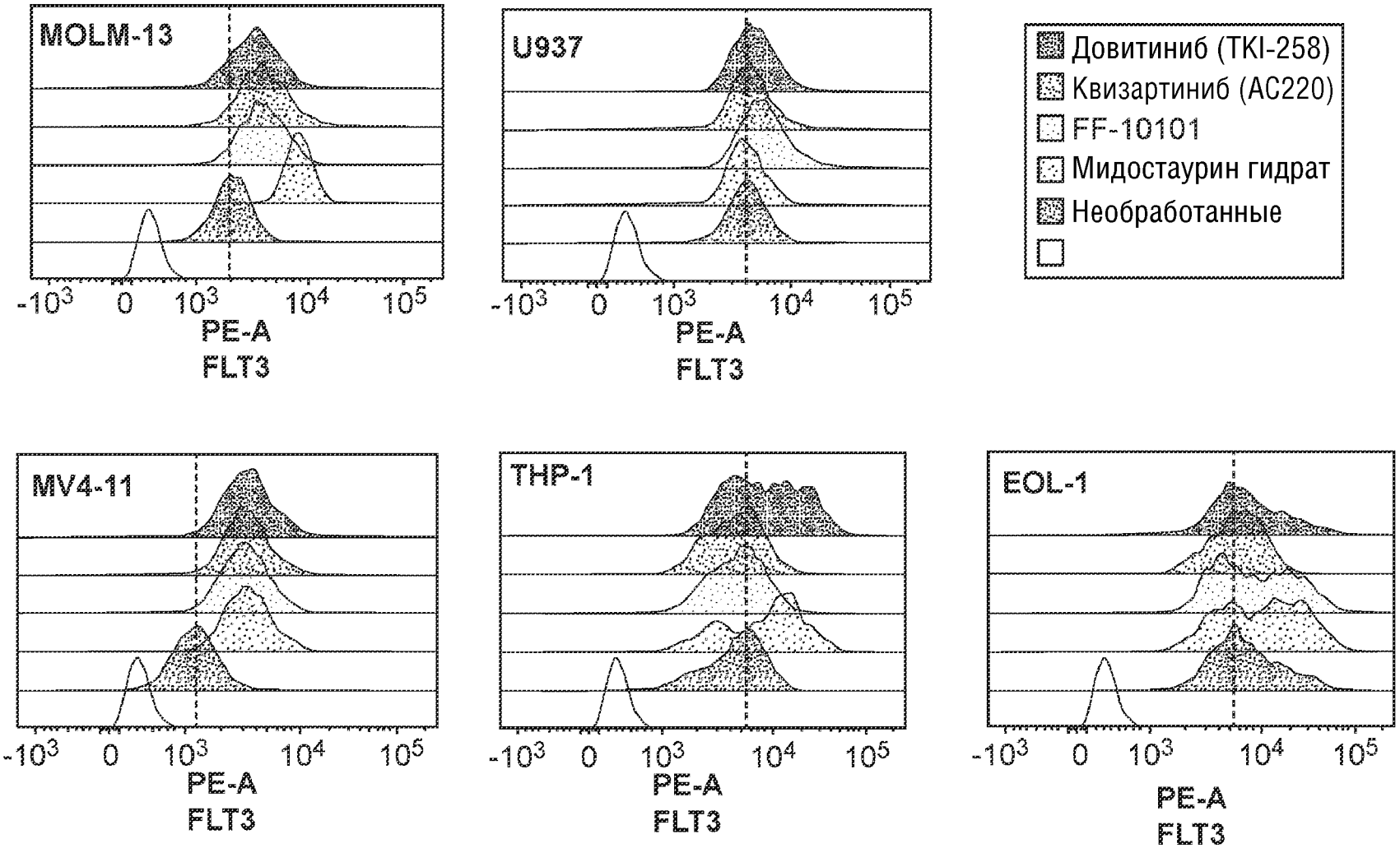

FLT3 CAR-анти-PD-1
FLT3 CAR
pCDH
MOLM-13
EOL-1
U937
Доли Sytox %
50
40
30
20
10
0
E:T=20:1
E:T=5:1
E:T=1:1

ФИГ.9

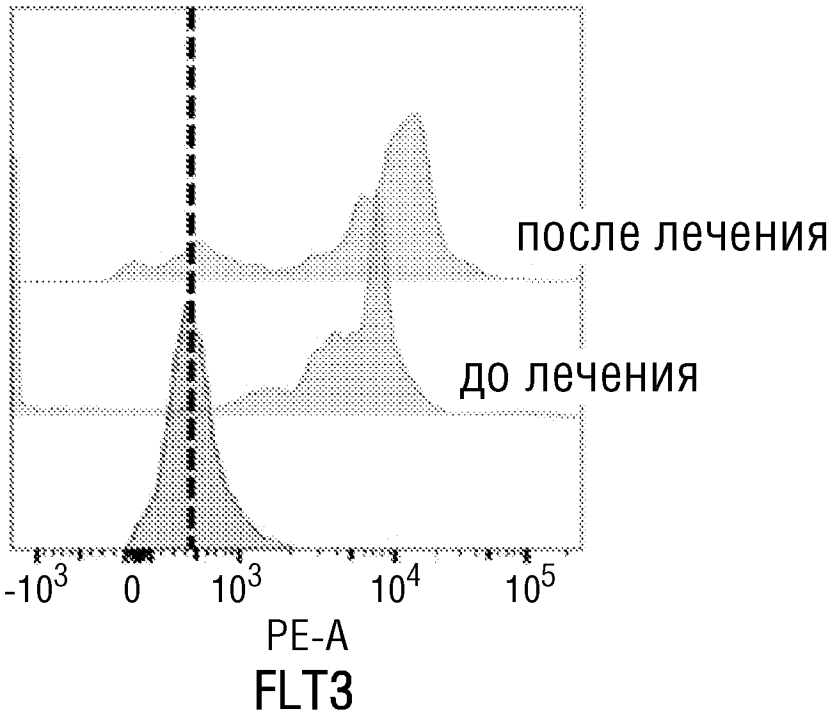


необработанные FLT3 FLT3+PD-1 s
FLT3+PD-1 s+PD-1 p FLT3+PD-1 a FLT3-PD-1+PD-1 s+PD-1 p

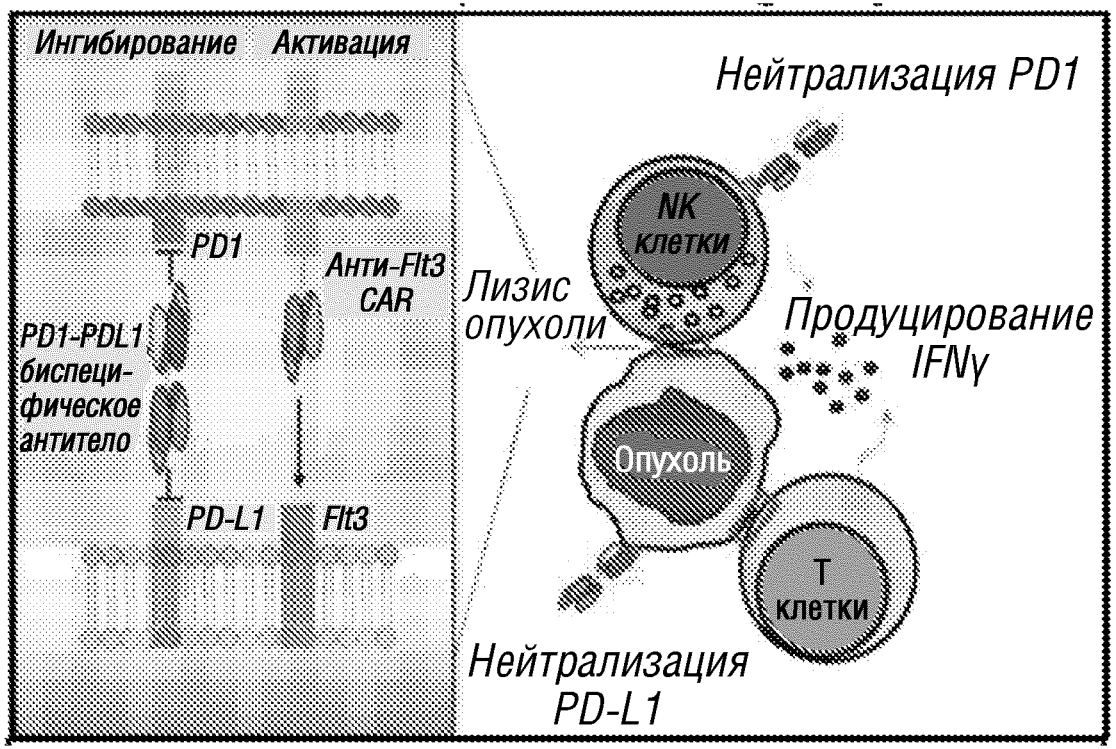
ФИГ.10


MOLM-13
U937
MV4-11
THP-1
EOL-1
-10^3
0
10^3
10^4
10^5
PE-A
FLT3
Довитиниб (TKI-258)
Квизартиниб (AC220)
FF-10101
Мидостаурин гидрат
Необработанные

ФИГ.11



ФИГ.12


Ингибирование
Активация
PD1
Анти-Flt3 CAR
PD1-PDL1 биспеци-фическое антитело
PD-L1
Flt3
Нейтрализация PD1
NK клетки
Лизис опухоли
Продуцирование IFNγ
Опухоль
T клетки
Нейтрализация PD-L1