

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040856**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.08.05(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)(21) Номер заявки
201990230(22) Дата подачи заявки
2017.07.07**(54) БЕЛКИ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ ЛИГАНД 1 ЗАПРОГРАММИРОВАННОЙ СМЕРТИ 1 (PD-L1), И СПОСОБЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**(31) **62/359,612**(56) **WO-A1-2016041945**(32) **2016.07.07****US-A1-2016137731**(33) **US**

M. SZNOL ET AL.: "Antagonist Antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the Treatment of Advanced Human Cancer", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 19, no. 5, 1 March 2013 (2013-03-01), pages 1021-1034, XP055123957, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2063 abstract page 1029, left-hand column, paragraph 3 - page 1032, left-hand column, paragraph 1; tables 1, 2

(43) **2019.07.31**(86) **PCT/US2017/041241**(87) **WO 2018/009894 2018.01.11**(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**АЙОВЭНС БАЙОТЕРАПЬЮТИКС,
ИНК. (US)**

JOEL SUNSHINE ET AL.: "PD-1/PD-L1 inhibitors", CURRENT OPINION IN PHARMACOLOGY, vol. 23, 1 August 2015 (2015-08-01), pages 32-38, XP055304528, NL ISSN: 1471-4892, DOI: 10.1016/j.coph.2015.05.011 abstract page 32, paragraph Early clinical development

(72) Изобретатель:
Рабинович Брайан (CA), Мартин-Ороско Наталия, Радваньи Ласло (US)

B. BOYERINAS ET AL.: "Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Activity of a Novel Anti-PD-L1 Antibody Avelumab (MSB0010718C) on Human Tumor Cells", CANCER IMMUNOLOGY RESEARCH, vol. 3, no. 10, 26 May 2015 (2015-05-26), pages 1148-1157, XP055389536, US ISSN: 2326-6066, DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0059 abstract page 1149, paragraph Antibodies and flow cytometric analysis page 1150, paragraph Tumor cell surface expression of PD-L1 det...

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

(57) Настоящее раскрытие предусматривает белки, такие как антитела, которые содержат антигенсвязывающую часть, которая специфически связывается с лигандом 1 запрограммированной смерти 1 (PD-L1). Также предусмотрены нуклеиновые кислоты, кодирующие белки, и клетки (например, генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты), которые содержат такие нуклеиновые кислоты. В некоторых вариантах осуществления рассматриваемый способ включает снижение взаимодействия между PD-L1 на первой клетке и PD-1 на второй клетке. В некоторых случаях контакт происходит in vivo. Например, предоставленные способы и композиции можно использовать при лечении вирусной инфекции и злокачественной опухоли, таком как лечение солидных опухолей через АСТ или через введение рассматриваемого белка, который специфически связывается с PD-L1.

B1**040856****040856 B1**

Перекрестная ссылка на связанные заявки

По данной заявке испрашивают приоритет предварительной заявки США № 62/359,612, поданной 7 июля 2016 года, все из которой в явной форме включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

Список последовательностей

Данная заявка содержит список последовательностей, который подан в электронной форме в формате ASCII и включен, таким образом, посредством ссылки в полном объеме. Указанная ASCII копия, созданная 15 января 2019 года, носит название "Списки последовательностей.txt" и имеет размер 103058 байтов.

Введение

Адоптивный перенос клеток (АСТ) представляет собой подход к лечению, в котором аутологичные Т-клетки пациента размножают, манипулируют ими *ex vivo* и затем повторно вводят пациенту для того, чтобы вызывать ответ, например, противоопухолевый ответ. Инфильтрирующие опухоль лимфоциты (ТИЛ) в целом относятся к гетерогенной популяции лимфоцитов, которые можно найти в микроокружении опухоли. Общее рациональное обоснование АСТ терапии с использованием ТИЛ состоит в том, что противоопухолевый иммунный ответ можно усиливать посредством удаления клеток с противоопухолевым потенциалом из иммуносупрессорного микроокружения опухоли, размножения клеток *in vitro* и последующего возвращения размноженной популяции клеток в места опухоли для того, чтобы уничтожить опухолевые клетки и, возможно, другие клеточные мишени, которые поддерживают опухоль, такие как эндотелиальные клетки сосудов. Lee and Margolin, *Curr. Oncol. Rep.* 2012; 14(5) 468-474.

Запрограммированная смерть 1 (PD-1) является подробно описанным ингибирующим рецептором, экспрессируемым на активированных Т-клетках человека, который, совместно со своими лигандами, лигандом 1 запрограммированной смерти 1 (PD-L1) и лигандом 2 запрограммированной смерти 1 (PD-L2), выполняет функцию фактора контрольной точки, ограничивающего опосредованную Т-клетками противоопухолевую активность при различных злокачественных опухолях человека, включая меланому. PD-1 экспрессируют ТИЛ, и по существу экспрессия PD-L1 в микроокружении опухоли ингибирует прогрессирование заболевания злокачественной опухоли, в том числе, например, опухолевый рост.

Соответственно в данной области существует необходимость в новых композициях и способах, которые препятствуют ингибирующему эффекту взаимодействия PD-1-PD-L1, например в контексте АСТ терапии с использованием ТИЛ.

Краткое изложение

Настоящее раскрытие предусматривает белки, такие как антитела, которые содержат антигенсвязывающую часть, которая специфически связывается с лигандом 1 запрограммированной смерти 1 (PD-L1). Также предусмотрены нуклеиновые кислоты, кодирующие белки, и клетки (например, генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты), которые содержат такие нуклеиновые кислоты. В некоторых вариантах осуществления рассматриваемый способ включает уменьшение взаимодействия между PD-L1 на первой клетке и PD-1 на второй клетке. Например, предусмотренные способы и композиции можно использовать при лечении вирусной инфекции и злокачественной опухоли, таком как лечение солидных опухолей через АСТ или через введение рассматриваемого белка, который специфически связывается с PD-L1.

Композиции и способы по настоящему раскрытию могут допускать рост и инфузию генетически модифицированных цитотоксических лимфоцитов, например, активированных Т-клеток, ТИЛ и NK клеток, в качестве клеточной терапии, которая допускает секрецию связывающего PD-L1 белка (например, scFV, макситела (maxibody)) в генетически модифицированных цитотоксических лимфоцитах подлежащих введению субъекту. Таким образом, цитотоксические лимфоциты по настоящему раскрытию способны "освободить" себя от ингибирующего эффекта контрольной точки PD-1, обеспечивая усовершенствованный эффект против злокачественной опухоли у субъекта, которому вводят генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты. Конкретные связывающие белки по раскрытию (например, антитела против PD-L1) также можно вводить индивидууму непосредственно, например, внутривенной (*i.v.*) или внутритритухолевой инъекцией.

Раскрытие предусматривает белок, который специфически связывается с PD-L1 и содержит антигенсвязывающую часть, которая содержит: (а) первый полипептид, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 2-4, и второй полипептид, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 6-8; или (б) первый полипептид, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 10-12, и второй полипептид, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 14-16, за тем исключением, что каждая из 3 аминокислотных последовательностей CDR первого и/или второго полипептида содержит две или меньше консервативных аминокислотных замен по отношению к точно определенному номеру SEQ ID.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая часть содержит первый полипептид, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 2-4, и второй полипептид, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 6-8.

В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая часть содержит первый полипептид, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 10-12, и второй полипептид, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 14-16.

В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9, и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления первый полипептид представляет собой легкую цепь, и второй полипептид представляет собой тяжелую цепь.

В некоторых вариантах осуществления белок, который специфически связывается с PD-L1, представляет собой одноцепочечное антитело (scFv), и первый и второй полипептиды сливают непосредственно или через линкер друг с другом. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 19.

В некоторых вариантах осуществления белок, который специфически связывается с PD-L1, представляет собой макситело, содержащее Fc домен иммуноглобулина, слитый непосредственно или через линкер с антигенсвязывающей частью. В некоторых вариантах осуществления Fc домен иммуноглобулина представляет собой Fc домен IgG1. В некоторых вариантах осуществления белок содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления Fc домен иммуноглобулина представляет собой Fc домен IgG4.

В некоторых вариантах осуществления белок, который специфически связывается с PD-L1, представляет собой гуманизированное антитело.

Настоящее раскрытие также предусматривает нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, который специфически связывается с PD-L1, как рассмотрено в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит промотор, который функционально связан с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой конститутивный промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой индуцибельный промотор.

Настоящее раскрытие также предусматривает клетку, содержащую нуклеиновую кислоту, которая кодирует белок, который специфически связывается с PD-L1. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту встраивают в геном клетки. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой цитотоксический лимфоцит, генетически модифицированный для того, чтобы экспрессировать и секретировать белок. В некоторых вариантах осуществления цитотоксический лимфоцит представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой CD8+ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой CD4+ Т-хелперную клетку. В некоторых вариантах осуществления Т-клетку извлекают из периферической крови. В некоторых вариантах осуществления цитотоксический лимфоцит представляет собой естественную киллерную (NK) клетку. В некоторых вариантах осуществления NK извлекают из периферической крови.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксический лимфоцит представляет собой инфильтрирующий опухоль лимфоцит (TIL), полученный из опухоли от субъекта.

В некоторых вариантах осуществления TIL содержит рецептор со специфичностью к антигену из опухоли.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксический лимфоцит демонстрирует повышенный уровень экспрессии одного или более антигенов активации относительно наивной Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления один или более антигенов активации выбирают из CD25, CD26, CD27, CD28, CD38, CD40L, CD69, CD134, CD137, BTLA, PD-1, HVEM, LIGHT и HLA-DR.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксический лимфоцит содержит Т-клеточный рецептор со специфичностью к опухолиассоциированному антигену.

Настоящее раскрытие также предусматривает способ, включающий: генетическую модификацию цитотоксического лимфоцита, выделенного из опухоли субъекта, посредством введения в цитотоксический лимфоцит нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, который специфически связывается с PD-L1, где генетически модифицированный цитотоксический лимфоцит экспрессирует и секретирует белок, который специфически связывается с PD-L1; размножение генетически модифицированного цитотоксического лимфоцита для того, чтобы создавать популяцию генетически модифицированных цитотоксических лимфоцитов; и введение популяции генетически модифицированных цитотоксических лимфоцитов субъекту для того, чтобы лечить опухоль.

В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированный цитотоксический лимфоцит конститутивно экспрессирует белок, который специфически связывается с PD-L1. В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированный цитотоксический лимфоцит индуцибельно экспрессирует белок, который специфически связывается с PD-L1. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота встраивается в геном цитотоксического лимфоцита.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксический лимфоцит представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой CD8+ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой CD4+ Т-хелперную клетку. В некоторых вариантах осуществления цитотоксический лимфоцит представляет собой естественную киллерную (NK) клетку.

В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированный цитотоксический лимфоцит содержит рецептор со специфичностью к антигену из опухоли.

В некоторых вариантах осуществления способ включает выделение цитотоксического лимфоцита у субъекта перед генетической модификацией.

В некоторых вариантах осуществления способа, белок, который специфически связывается с PD-L1, содержит антигенсвязывающую часть, которая содержит: (а) первый полипептид, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 2-4, и второй полипептид, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 6-8; или (б) первый полипептид, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 10-12, и второй полипептид, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 14-16, за тем исключением, что каждая из 3 аминокислотных последовательностей CDR первого и/или второго полипептида содержит две или меньше консервативных аминокислотных замен по отношению к точно определенному номеру SEQ ID.

В некоторых вариантах осуществления способа, антигенсвязывающая часть содержит первый полипептид, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 2-4, и второй полипептид, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 6-8.

В некоторых вариантах осуществления способа, первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления способа, антигенсвязывающая часть содержит первый полипептид, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 10-12, и второй полипептид, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 14-16.

В некоторых вариантах осуществления способа, первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9, и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления способа, первый полипептид представляет собой легкую цепь, и второй полипептид представляет собой тяжелую цепь.

В некоторых вариантах осуществления способа, белок представляет собой одноцепочечное антитело (scFv) и первый и второй полипептиды сливаются непосредственно или через линкер друг с другом.

В некоторых вариантах осуществления способа, scFv содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 19.

В некоторых вариантах осуществления способа, белок представляет собой макситело, содержащее Fc домен иммуноглобулина, слитый непосредственно или через линкер с антигенсвязывающей частью.

В некоторых вариантах осуществления способа, Fc домен иммуноглобулина представляет собой Fc домен IgG1.

В некоторых вариантах осуществления способа, белок содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20.

Настоящее раскрытие также предусматривает способ получения генетически модифицированного цитотоксического лимфоцита, способ включает: генетическую модификацию цитотоксического лимфоцита, выделенного у субъекта, который имеет или предположительно имеет злокачественную опухоль, посредством введения в цитотоксический лимфоцит нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, который специфически связывается с PD-L1, где генетически модифицированный цитотоксический лимфоцит экспрессирует и секретирует белок, который специфически связывается с PD-L1. В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированный цитотоксический лимфоцит конститутивно экспрессирует белок, который специфически связывается с PD-L1. В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированный цитотоксический лимфоцит индуцибельно экспрессирует белок, который специфически связывается с PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления способ включает размножение цитотоксического лимфоцита *in vitro* для того, чтобы предоставлять размноженную популяцию генетически модифицированных цитотоксических лимфоцитов.

В некоторых вариантах осуществления способ включает выделение цитотоксического лимфоцита у субъекта перед генетической модификацией.

В некоторых вариантах осуществления выделения включает выделение цитотоксического лимфоцита из опухоли субъекта. В некоторых вариантах осуществления выделения включает выделение цитотоксического лимфоцита из периферической крови субъекта.

В некоторых вариантах осуществления способа, цитотоксический лимфоцит представляет собой Т-

клетку. В некоторых вариантах осуществления способа, Т-клетка представляет собой CD8+ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления способа, Т-клетка представляет собой CD4+ Т-хелперную клетку. В некоторых вариантах осуществления способа, цитотоксический лимфоцит представляет собой естественную киллерную (NK) клетку.

В некоторых вариантах осуществления способа, нуклеиновая кислота встраивается в геном цитотоксического лимфоцита.

В некоторых вариантах осуществления способа, цитотоксический лимфоцит демонстрирует повышенный уровень экспрессии одного или более антигенов активации относительно наивной Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления способа, один или более антигенов активации выбирают из CD25, CD26, CD27, CD28, CD38, CD40L, CD69, CD134, CD137, BTLA, PD-1, HVEM, LIGHT и HLA-DR.

В некоторых вариантах осуществления способа, генетически модифицированный цитотоксический лимфоцит содержит Т-клеточный рецептор со специфичностью к антигену из опухоли субъекта.

Настоящее раскрытие также предусматривает способ лечения индивидуума, который имеет или предположительно имеет злокачественную опухоль, способ включает: введение белка, который специфически связывается с PD-L1, индивидууму (например, субъекту или пациенту, в том числе, например, млекопитающему, такому как человек).

В некоторых вариантах осуществления способа, введение включает введение субъекту нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, который специфически связывается с PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления способа, введение включает введение субъекту генетически модифицированного цитотоксического лимфоцита, который экспрессирует и секретирует белок, который специфически связывается с PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления способа генетически модифицированный цитотоксический лимфоцит конститутивно экспрессирует белок, который специфически связывается с PD-L1. В некоторых вариантах осуществления способа генетически модифицированный цитотоксический лимфоцит индуцибельно экспрессирует белок, который специфически связывается с PD-L1. В некоторых вариантах осуществления способа включает индуцирование экспрессии белка, который специфически связывается с PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления способа цитотоксический лимфоцит представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления способа Т-клетка представляет собой CD8+ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления способа Т-клетка представляет собой CD4+ Т-хелперную клетку. В некоторых вариантах осуществления способа цитотоксический лимфоцит представляет собой естественную киллерную (NK) клетку.

В некоторых вариантах осуществления способа цитотоксический лимфоцит демонстрирует повышенный уровень экспрессии одного или более антигенов активации относительно наивной Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления способа один или более антигенов активации выбирают из CD25, CD26, CD27, CD28, CD38, CD40L, CD69, CD134, CD137, BTLA, PD-1, HVEM, LIGHT и HLA-DR.

В некоторых вариантах осуществления способа генетически модифицированный цитотоксический лимфоцит содержит Т-клеточный рецептор со специфичностью к антигену из опухоли субъекта.

Настоящее раскрытие также предусматривает способ уменьшения взаимодействия между PD-L1 на первой клетке и PD-1 на второй клетке, способ включает: контакт PD-L1 на первой клетке с белком, который специфически связывается с PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления способа первую и вторую клетки вводят индивидууму и контакт включает введение белка, который специфически связывается с PD-L1. В некоторых вариантах осуществления способа введение включает системное введение. В некоторых вариантах осуществления способа введение включает местное введение. В некоторых вариантах осуществления способа местное введение включает внутриопухолевое введение. В некоторых вариантах осуществления способа индивидуум имеет злокачественную опухоль. В некоторых вариантах осуществления способа индивидуум имеет солидную опухоль.

Краткое описание фигур

Изобретение может быть лучше всего понято из следующего подробного описания, при прочтении в сочетании с сопроводительными рисунками. В рисунки включены следующие фигуры.

На фиг. 1 приведено схематическое представление лентивирусной плазмиды, используемой для того, чтобы получать 38A1-Fc, 19H9-Fc и FMC63-Fc. Максителя против PD-L1 закодированы ниже промотора U3 из промотора MSCV и выше кассеты IRES-eGFP.

На фиг. 2 приведено схематическое представление ретровирусной плазмиды, используемой для того, чтобы получать 38A1-Fc, 19H9-Fc и FMC63-Fc. Максителя против PD-L1 закодированы ниже промотора U3 из промотора MSCV и выше кассеты IRES-eGFP.

На фиг. 3А, В приведены данные из ELISA на основе клеток для того, чтобы определять аффинность 38A1-scFV-Fc и 19H9-scFV-Fc к PD-L1. 293-PD-L1 окрашивали с использованием 19H9-scFV-Fc (часть А) или 38A1-scFV-Fc (часть В). Максителя титровали от 100 нМ до 0,01 нМ на 293-PD-L1, промывали и окрашивали с использованием HRP-меченного специфического антитела против Fc_γ человека. Связывание определяли по оптической плотности на 450 нм после добавления ТМВ (3,3',5,5'-

тетраметилбензидин). 12D10-scFV-Fc использовали в качестве отрицательного контроля.

На фиг. 4А-С приведены данные, показывающие, что 293-PD-L1 клетки связывают максител против PD-L1, секретируемые Т-клетками Jurkat. Т-клетки Jurkat, стабильно экспрессирующие FMC63-scFV-Fc (часть А), 38A1-scFV-Fc (часть В) или 19H9-scFV-Fc (часть С), совместно культивировали в соотношении 1:1 в течение 16 ч. Клетки собирали и окрашивали с использованием меченного Alexa 647 специфического антитела против Fc γ человека. По сравнению с максителом отрицательного контроля (FMC63-scFV-Fc), наблюдали увеличенную в 100-300 раз среднюю интенсивность флуоресценции (связывание макситела) для 19H9-scFV-Fc и 38A1-scFV-Fc соответственно.

На фиг. 5А-Д приведены данные, показывающие, что 293-PD-L1 клетки связывают максител против PD-L1, секретируемые инфильтрирующими опухоль лимфоцитами (TIL). Супернатант из TIL линий M1034 (часть А, часть В) и M1015 (часть С, часть Д), стабильно экспрессирующих FMC63-scFV-Fc (часть А, часть С) или 38A1-scFV-Fc (часть В, часть Д), концентрировали в 10 раз и использовали для того, чтобы окрашивать 293-PD-L1. Максителя обнаруживали с использованием меченного Alexa 647 специфического антитела против Fc γ человека. По сравнению с максителом отрицательного контроля (FMC63-scFV-Fc), авторы изобретения наблюдали больше чем 50-кратное увеличение средней интенсивности флуоресценции (связывание макситела) для 38A1-scFV-Fc.

На фиг. 6 приведены данные, показывающие способность максител против PD-L1 ограничивать опосредованное PD-L1 ингибирование NFAT активности. Т-клетки Jurkat, экспрессирующие PD1 и люциферазу светляка ниже промотора NFAT, совместно культивировали в соотношении 2:1 с клетками CHO, экспрессирующими PD-L1 и проприетарный Т-клеточный агонистический белок (PD1/PD-L1 Blockade Bioassay Kit, Promega, номер по каталогу CS187111) и одно из 12D10-scFV-Fc (отрицательный контроль; серый), 19H9-scFV-Fc (красный), 38A1-scFV-Fc (синий) или PD1-специфического антитела положительного контроля EH12.2H7 (Biolegend; зеленый). Максителя титровали от 25 до 0,016 мкг/мл. Активацию Т-клеток Jurkat (деингибирование PD-L1) измеряли в виде биOLUMИнесцентной активности (относительные люминесцентные единицы; RLU) после добавления 5'-фторлюциферина.

На фиг. 7 приведены последовательности антигенсвязывающих областей вновь созданных антител 38A1 и 19H9, а также примеры scFV белков (например, scFV и слияния scFV-FC), которые содержат антигенсвязывающие области 38A1 или 19H9.

На фиг. 8 изображена схема примера экспрессирующего вектора (например, лентивектора), кодирующего индуцибельный промотор

На фиг. 9 изображена схема примера экспрессирующего вектора (например, лентивектора), кодирующего индуцибельный промотор.

На фиг. 10 приведена последовательность пустого вектора для вектора pLEV, используемого в качестве образцового вектора в данных способах. pLV430G (лентивирусный вектор) (SEQ ID NO: 35) (А) и pCIGO-VSV.G (VSVG) (SEQ ID NO: 36) (В).

На фиг. 11А, В приведены нуклеотидные последовательности полного вектора для pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37) (А) и pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38) (В).

На фиг. 12 приведены данные, показывающие, что 19H9 демонстрирует более высокую способность к секреции. Приведено сравнение способности к секреции у клеток Jurkat, чрезмерно экспрессирующих ScFV против PD-L1 клона 19H9 в сравнении с 38A1. Супернатант от клеток Jurkat, чрезмерно экспрессирующих ScFV против PD-L1 клона 19H9 и 38A1, собирали и концентрировали для анализа ELISA IgG, чтобы определять концентрацию ScFV против PD-L1. Обнаружено, что клетки Jurkat клона 19H9 имели более высокую способность к секреции по сравнению с 38A1 (9,82 против 6,75 мкг/клетки).

На фиг. 13А, В приведены данные, показывающие, что 38A1 демонстрирует более высокую связывающую способность в клетках Jurkat, чрезмерно экспрессирующих PD-L1. Исследовали аффинность связывания ScFV против PD-L1 клона 19H9 и 38A1 с использованием EL4 PD-L1 клеток. EL4 PD-L1 инкубировали с ScFV против PD-L1 клона 19H9 или 38A1 в концентрациях 1, 3, 10, 30, 100 и 300 нг/мл и окрашивали с использованием Amcyan и FITC козы против человека. Клетки промывали с использованием буфера FACs и анализировали посредством проточной цитометрии. Клон 38A1 демонстрировал более высокую связывающую способность в клетках Jurkat, чрезмерно экспрессирующих PD-L1, как по процентной доле PD-L1 положительных клеток (А), так и по средней интенсивности флуоресценции (MFI) (В).

На фиг. 14А, В приведены данные, показывающие, что 38A1 демонстрирует более высокую связывающую способность в опухолевых клетках меланомы. Приведено сравнение аффинности связывания ScFV против PD-L1 клона 19H9 и 38A1 с использованием EL4 PD-L1 клеток. EL4 PD-L1 инкубировали с ScFV против PD-L1 клона 19H9 или 38A1 в концентрациях 1, 3, 10, 30, 100 и 300 нг/мл и окрашивали с использованием Amcyan и FITC козы против человека. Клетки промывали с использованием буфера FACs и анализировали посредством проточной цитометрии. Клон 38A1 демонстрировал более высокую связывающую способность в клетках Jurkat, чрезмерно экспрессирующих PD-L1, как по процентной доле PD-L1 положительных клеток (А), так и по средней интенсивности флуоресценции (MFI) (В). Для того чтобы валидировать связывание ScFV против PD-L1 в опухолевых клетках, три опухолевых клетки меланомы лечили с использованием IFN- γ (100 нг/мл) для того, чтобы усилить экспрессию PD-L1. После

трех суток клетки собирали с использованием буфера для диссоциации клеток, инкубировали с ScFV против PD-L1 клона 19H9 или 38A1 в концентрации 100 нг/мл и окрашивали с использованием FITC козы против человека. Клетки промывали с использованием буфера FACS и анализировали посредством проточной цитометрии. Авторы изобретения обнаруживали, что клон 38A1 демонстрировал более высокую аффинность связывания как по процентной доле PD-L1 положительных клеток, так и по MFI. В общем, клон 38A1 имеет более высокую аффинность связывания, но слегка меньшую способность к секреции по сравнению с клоном 19H9.

На фиг. 15А, В приведены данные, показывающие, что 38A1 демонстрирует более высокую биологическую функцию, чем 19H9. Для того чтобы дополнительно определять биологическую функцию двух клонов ScFV против PD-L1 (19H9 и 38A1), проводили анализ блокады PD-L1, который можно использовать для того, чтобы определять силу антитела против PD-1 или PD-L1, которое блокирует вовлечение во взаимодействие PD-1 и PD-L1. Анализ состоит из двух генетически сконструированных клеточных линий: PD-1 эффекторная клетка (Т-клетки Jurkat, стабильно экспрессирующие PD-1 человека и NFAT-индуцируемую люциферазу) и клетки PD-L1 aAPC/CHO-K1, стабильно экспрессирующие PD-L1 человека с белком клеточной поверхности, активирующим когнатные TCR. Когда два типа клеток культивировали совместно, вовлечение PD-1 и PD-L1 ингибировало передачу TCR сигналов и снижало активность люциферазы. Добавление блокирующего антитела против PD-1 или PD-L1 помогало освобождать ингибирующий сигнал, что вело к усиленной передаче TCR сигналов и NFAT-опосредованной активности люциферазы. Обнаруживали, что сигнал люциферазы (RLU) больше при блокировании с использованием средства против PD-L1 по сравнению со средством против PD1, что подсказывает, что блокирование PD-L1 казалось более эффективным, чем PD-1 в этом контексте (А). В соответствии с ожиданиями, ScFV против PD-L1 клона 38A1, у которого ранее показана более высокая аффинность связывания, обеспечивал более высокую биологическую функцию из-за сильного увеличения сигнала люциферазы как в условиях очищенного ScFV (Р), так и в не очищенных условиях (NP) (В).

На фиг. 16 приведены карты векторов для pLV4301G PDLV scFV 38A1 (А) и pLV4301G PDLV scFV 19H9 (В).

На фиг. 17 приведены примеры последовательностей IgG1 (SEQ ID NO: 39), IgG2 (SEQ ID NO: 40), IgG3 (SEQ ID NO: 41) и IgG4 (SEQ ID NO: 42).

Подробное описание

Настоящее раскрытие предусматривает белки, такие как антитела, которые содержат антигенсвязывающую часть, которая специфически связывается с лигандом 1 запрограммированной смерти 1 (PD-L1). Также предусмотрены нуклеиновые кислоты, кодирующие белки, и клетки (например, генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты), которые содержат такие нуклеиновые кислоты. В некоторых вариантах осуществления рассматриваемый способ включает уменьшение взаимодействия между PD-L1 на первой клетке и PD-1 на второй клетке. Например, предоставленные способы и композиции можно использовать при лечении вирусных инфекций и злокачественной опухоли, таком как лечение солидных опухолей через АСТ или через введение рассматриваемого белка, который специфически связывается с PD-L1.

Композиции и способы по настоящему раскрытию предусматривают генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты, например, активированные Т-клетки, Т1L и NK клетки, которые можно распространять и инфузировать в качестве клеточной терапии, что ведет к секреции связывающего PD-L1 белка (например, scFV, макситела и т.п.) в генетически модифицированных цитотоксических лимфоцитах, инфузировав субъекту. Таким образом, цитотоксические лимфоциты по настоящему раскрытию способны "освободить" себя от ингибирующего эффекта контрольной точки PD-1, обеспечивая усовершенствованный эффект против злокачественной опухоли. Конкретные связывающие белки по раскрытию (например, антитела против PD-L1) также можно вводить индивидууму непосредственно, например, внутривенной (i.v.) или внутриопухолевой инъекцией.

Прежде чем описать настоящее изобретение более подробно, следует понимать, что это изобретение не ограничено конкретными описанными вариантами осуществления, и по существу, конечно, оно может варьировать. Также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем описании, служит только цели описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена в качестве ограничения, поскольку объем настоящего изобретения ограничен только приложенной формулой изобретения.

Когда приведен диапазон значений, понятно, что каждое промежуточное значение, до десятой доли единицы нижнего предела, пока контекст не диктует иное явным образом, между верхним и нижним пределами этого диапазона, также конкретно раскрыто. Каждый меньший диапазон между любым заявленным значением или промежуточным значением в заявленном диапазоне и любым другим заявленным или промежуточным значением в этом заявленном диапазоне охвачен изобретением. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов можно независимо включать или исключать в диапазоне, и каждый диапазон, в котором один из, ни один из или оба из пределов включены в меньшие диапазоны, также охвачены изобретением, с учетом любого конкретного исключенного предела в заявленном диапазоне. Когда заявленный диапазон содержит один или оба предела, диапазон, не содержащий любой один из или оба из этих включенных пределов, также включены в изобретение.

Пока не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют то же значение, в каком их обычно понимает специалист в области, к которой относится это изобретение. Определения и использование таких терминов встречаются в контексте различных стандартных источников, включающих, в качестве примера, J. Sambrook and D. W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 4-е изд., 2012; F. M. Ausubel, ред., *Short Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols; 5-е изд., 2002; B. Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, 4-е изд., Garland, 2002; D. L. Nelson and M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4-е изд., W.H. Freeman & Company, 2004; and Herdewijn, P. (ред.), *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications*, *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, 2004. Несмотря на то, что любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, что описаны в настоящем описании, можно использовать при практической реализации или тестировании настоящего изобретения, описаны предпочтительные способы и материалы.

Как используют в настоящем описании, каждый из следующих терминов имеет значение, связанное с ним в этом разделе.

Формы единственного числа используют в настоящем описании для обозначения одного или больше чем одного (т.е. по меньшей мере одного) рассматриваемого грамматического объекта. В качестве примера, "элемент" обозначает один элемент или больше чем один элемент.

"Приблизительно", как используют в настоящем описании в отношении поддающегося измерению значения, такого как количество, длительность времени и т.п., обозначает, что включены вариации $\pm 20\%$ или $\pm 10\%$, более предпочтительно $\pm 5\%$, даже более предпочтительно $\pm 1\%$, и еще более предпочтительно $\pm 0,1\%$ от указанного значения, поскольку такие вариации подходят для того, чтобы осуществлять раскрытые способы.

Термин "противоопухолевый эффект", как используют в настоящем описании, относится к биологическому эффекту, который может быть проявлен в уменьшении объема опухоли, уменьшении числа опухолевых клеток, уменьшении числа метастазов, увеличении ожидаемой продолжительности жизни или улучшении различных физиологических симптомов, связанных со злокачественным состоянием. "Противоопухолевый эффект" также может проявляться в способности раскрытых композиций и способов предотвращать возникновение опухоли в первом месте.

Термин "антитело" используют в самом широком смысле, и он включает, например, интактный иммуноглобулин или его антигенсвязывающую часть, которые конкурируют с интактным антителом за специфическое связывание, если не указано иное. Антигенсвязывающие части можно получать с помощью способов рекомбинантной ДНК или с помощью ферментативного или химического расщепления интактных антител. Антигенсвязывающие части включают Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv и доменные антитела (dAb), а также фрагменты определяющих комплементарность областей (CDR), одноцепочечные антитела (одноцепочечные фрагменты переменных доменов; scFv), диатела, триатела, тетратела и полипептиды, которые содержат по меньшей мере часть иммуноглобулина, которой достаточно для того, чтобы придавать полипептиду связывание специфического антигена. Антитело включает антитело человека, гуманизированное антитело, химерное антитело, моноклональное антитело, поликлональное антитело, рекомбинантное антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела, одноцепочечное антитело, макситело (scFv, слитый посредством линкера или непосредственного прикрепления с Fc или фрагментом Fc), диатело, триатело, тетратело, Fab фрагмент, F(fa')_x фрагмент, доменное антитело, антитело IgD, антитело IgE и антитело IgM, а также антитело IgG1 и антитело IgG2 и антитело IgG3 и антитело IgG4, а также антитело IgG4, имеющее по меньшей мере одну мутацию в шарнирной области, которая смягчает склонность к дисульфидным связям внутри H-цепи.

"Fab фрагмент" представляет собой одновалентный фрагмент, который имеет домены VL, VH, CL и CH1; F(ab')₂ фрагмент представляет собой двухвалентный фрагмент, который имеет два Fab фрагмента, связанные дисульфидным мостиком в шарнирной области; Fd фрагмент имеет домены VH и CH1; Fv фрагмент имеет домены VL и VH из одного плеча антитела; и dAb фрагмент имеет домен VH, домен VL или антигенсвязывающий фрагмент домена VH или VL.

"Одноцепочечное антитело" (scFv) представляет собой антитело, в котором область VL и VH сливают непосредственно или соединяют через линкер (например, синтетическую последовательность аминокислотных остатков) для того, чтобы формировать непрерывную белковую цепь, в которой линкер имеет достаточную длину для того, чтобы сделать возможной укладку белковой цепи на себе самой и формирование одновалентного антигенсвязывающего участка (см., например, Bird et al., 1988, *Science* 242:423-26 и Huston et al, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-83). Диатела представляют собой двухвалентные антитела, содержащие две полипептидные цепи, где каждая полипептидная цепь содержит домены VH и VL, соединенные линкером, который слишком короток для того, чтобы сделать возможным образование пар между двумя доменами одной цепи, таким образом позволяя каждому домену образовывать пару с комплементарным доменом на другой полипептидной цепи (см., например, Holliger et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-48, и Poljak et al., 1994, *Structure* 2:1121-23). Если две полипептидные цепи диатела идентичны, тогда диатело в результате образования их пары будет иметь два

идентичных антигенсвязывающих участка. Полипептидные цепи, имеющие различные последовательности, можно использовать для получения диатела с двумя различными антигенсвязывающими участками. Аналогичным образом триатела и тетраатела представляют собой антители, содержащие три и четыре полипептидные цепи соответственно и образующие три и четыре антигенсвязывающих участка соответственно, которые могут представлять собой одно и то же или различное.

Определяющие комплементарность области (CDR) и каркасные области (FR) заданного антителя можно идентифицировать с использованием системы, описанной Kabat et al. в Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е изд., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, публикация NIH № 91-3242, 1991. Одну или более CDR можно встраивать в молекулу ковалентно или нековалентно, чтобы сделать ее антигенсвязывающим белком. Антигенсвязывающий белок может содержать CDR в качестве части более длинной полипептидной цепи, может ковалентно связывать CDR с другой полипептидной цепью или может содержать CDR нековалентно. CDR позволяют антигенсвязывающему белку специфически связываться с конкретным антигеном, представляющим интерес.

Термин "антитело человека" включает все антители, которые имеют одну или более переменных и константных областей, полученных из последовательностей иммуноглобулинов человека. В одном из вариантов осуществления все переменные и константные домены получают из последовательностей иммуноглобулинов человека (полностью антители человека). Антитела человека можно получать различными способами, в том числе иммунизацией мыши, которую генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать антитела человека. Можно конструировать штаммы мышей с дефицитом продуцирования антител мыши, используя большие фрагменты локусов Ig человека, ожидая, что такие мыши будут продуцировать антитела человека в отсутствие антител мыши. Большие фрагменты Ig человека могут сохранять большое разнообразие переменных генов, а также надлежащую регуляцию продуцирования и экспрессии антител. Используя мышинные механизмы для диверсификации и отбора антител и отсутствие иммунологической толерантности к белкам человека, воспроизведенный репертуар антител человека в этих штаммах мышей может давать высокую аффинность полностью антителя человека к любому антигену, представляющему интерес, в том числе к антигенам человека. Используя гибридную технологию, можно получать и отбирать антигенспецифические MAб человека с желаемой специфичностью. Антитела человека также можно получать посредством пэннинга библиотек антител человека, экспрессируемых на фаге, фагидах, рибосомах или других частицах.

"Гуманизованное антитело" имеет последовательность, которая отличается от последовательности антителя, полученного у не являющихся человеком биологического вида, на одну или более замен, делеций и/или добавлений аминокислот так, что гуманизованное антитело с меньшей вероятностью индуцирует иммунный ответ и/или индуцирует менее тяжелый иммунный ответ, по сравнению с антителом не являющегося человеком биологического вида, когда его вводят человеческому субъекту. В одном из вариантов осуществления определенные аминокислоты из каркасных и константных доменов тяжелых и/или легких цепей антителя не являющегося человеком биологического вида мутируют для того, чтобы получать гуманизованное антитело. В другом варианте осуществления константный домен(ы) из антителя человека сливаются с переменным доменом(ми) не являющегося человеком биологического вида. В другом варианте осуществления один или более аминокислотных остатков в одной или более последовательностях CDR не принадлежащего человеку антителя заменяют для того, чтобы снизить вероятную иммуногенность не принадлежащего человеку антителя, когда его вводят человеческому субъекту, где замененные аминокислотные остатки или не являются критичными для иммуноспецифического связывания антителя с его антигеном или замены на аминокислотную последовательность, которую выполняют, представляют собой консервативные замены, так что связывание гуманизованного антителя с антигеном не значительно хуже, чем связывание не принадлежащего человеку антителя с антигеном. Примеры способов получения гуманизованных антител можно найти в патентах США №№ 6054297, 5886152 и 5877293, раскрытия каждого из которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

Термин "химерное антитело" относится к антителу, которое содержит одну или более областей из одного антителя и одну или более областей из одного или более других антител. "Антитело с пересаженной CDR" представляет собой антитело, содержащее одну или более CDR, полученных из антителя конкретного вида или изоформа, и каркас другого антителя того же или другого вида или изоформа.

Термин " $K_{ассоц.}$ " или " K_a ", как используют в настоящем описании, предназначен для обозначения скорости ассоциации конкретного взаимодействия антители-антиген, тогда как термин " $K_{диссоц.}$ " или " K_d ", как используют в настоящем описании, предназначен для обозначения скорости диссоциации конкретного взаимодействия антители-антиген. Термин " K_D ", как используют в настоящем описании, предназначен для обозначения константы диссоциации, которую получают из соотношения K_d и K_a (т.е. K_d/K_a) и выражают в виде молярной концентрации (M). Значения K_D для антител можно определять с использованием способов, общепризнанных в данной области. В некоторых вариантах осуществления способ определения K_D антителя опосредован использованием поверхностного плазмонного резонанса, например, использованием биосенсорной системы, такой как система Biacore®.

Как используют в настоящем описании, термин "высокая аффинность" для антителя IgG относится к антителу, имеющему K_D 10^{-8} M или меньше, в некоторых вариантах осуществления 10^{-9} M или меньше,

и в некоторых вариантах осуществления 10^{-10} М или меньше в отношении целевого антигена. Однако связывание с "высокой аффинностью" может варьировать для антител других изотипов. Например, связывание с "высокой аффинностью" для изотипа IgM относится к антителу, имеющему K_D 10^{-7} М или меньше, в некоторых вариантах осуществления 10^{-8} М или меньше и в некоторых вариантах осуществления 10^{-9} М или меньше.

"Конститутивная" экспрессия включает состояние, в котором продукт гена получают в живой клетке при большинстве или всех физиологических условиях клетки.

"Кодирующая область" гена содержит нуклеотидные остатки кодирующей нити гена и нуклеотиды некодирующей нити гена, которые гомологичны или комплементарны, соответственно, кодирующей области молекулы мРНК, которую получают посредством транскрипции гена. "Кодирующая область" молекулы мРНК также содержит нуклеотидные остатки молекулы мРНК, которые совпадают с областью антикодона молекулы транспортной РНК в ходе трансляции молекулы мРНК или которые кодируют терминирующий кодон. Кодирующая область может, таким образом, содержать нуклеотидные остатки, содержащие кодоны для аминокислотных остатков, которые не присутствуют в зрелом белке, кодируемом молекулой мРНК (например, аминокислотные остатки в сигнальной последовательности экспорта белка).

Под "инфильтрирующими опухоль лимфоцитами" или "TIL" в настоящем описании понимают популяцию клеток, исходно полученных в виде белых клеток крови, которые покинули кровотока субъекта и мигрировали в опухоль. TIL включают, но не ограничиваясь этим, CD8+ цитотоксические Т-клетки (лимфоциты), Th1 и Th17 CD4+ Т-клетки, естественные киллерные клетки, дендритные клетки и M1 макрофаги. TIL включают первичные и вторичные TIL. "Первичные TIL" представляют собой те, которые получают из образцов тканей пациента, как обозначено в настоящем описании (иногда обозначают как "свежесобранные"), а "вторичные TIL" представляют собой любые популяции TIL клеток, которые размножились или пролиферировали, как рассмотрено в настоящем описании, включая в качестве неограничивающих примеров не сортированные TIL и размноженные TIL ("REP TIL"), как рассмотрено в настоящем описании.

TIL в целом можно определять или биохимически, используя поверхностные клеточные маркеры, или функционально, по их способности инфильтрировать опухоли и осуществлять лечение. TIL в целом можно классифицировать по экспрессии одного или более из следующих биомаркеров: CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD-1 и CD25. Дополнительно и альтернативно, TIL можно функционально определять по их способности инфильтрировать солидные опухоли при повторном введении пациенту.

Термин "цитотоксический лимфоцит" включает цитотоксические Т (CTL) клетки (в том числе CD8+ цитотоксические Т-лимфоциты и CD4+ Т-хелперные лимфоциты), естественные киллерные Т (NKT) клетки и естественные киллерные (NK) клетки. Цитотоксические лимфоциты могут включать, например, полученные из периферической крови $\alpha\beta$ TCR-положительные или $\gamma\delta$ TCR-положительные Т-клетки, активированные опухолеспецифическими антигенами и/или трансдуцированные с использованием опухолеспецифических химерных антигенных рецепторов или Т-клеточных рецепторов, и инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL). Цитотоксический лимфоцит в целом уничтожает клетки злокачественной опухоли, клетки, которые инфицированы (в частности, вирусами), или клетки, которые иным образом повреждены или дефектны. Цитотоксический лимфоцит также можно обозначать как цитотоксическая Т-клетка, ТС, цитотоксический Т-лимфоцит, CTL, Т-киллерная клетка, цитолитическая Т-клетка, CD8+ Т-клетка или киллерная Т-клетка представляет собой Т-лимфоцит (определенный тип белых клеток крови).

Термины "фрагментирование", "фрагмент" и "фрагментированный", как используют в настоящем описании для того, чтобы описывать процессы разрушения опухоли, включают способы механической фрагментации, такие как дробление, резание, разделение и кускование опухолевой ткани, а также любой другой способ разрушения физической структуры опухолевой ткани.

Термин "in vivo" относится к событию, которое происходит в организме субъекта.

Термин "in vitro" относится к событию, которое происходит вне организма субъекта. Анализ in vitro охватывает анализы на основе клеток, в которых используют клетки, живые или погибшие, а также может охватывать бесклеточный анализ, в котором не используют интактные клетки.

Термин "антитело против CD3" относится к антителу или его варианту, например, моноклональному антителу, и включает человеческие, гуманизированные, химерные или мышинные антитела, которые направлены против рецептора CD3 в Т-клеточном антигенном рецепторе зрелых Т-клеток. Антитела против CD3 включают ОКТ-3, также известный как муромонаб. Другие антитела против CD3 включают, например, отеликсизумаб, теплизумаб и визилизумаб.

Термин "ОКТ-3" (также обозначают в настоящем описании как "ОКТ3") относится к моноклональному антителу или его биосимиляру или варианту, в том числе человеческим, гуманизированным, химерным или мышинным антителам, направленным против рецептора CD3 в Т-клеточном антигенном рецепторе зрелых Т-клеток, и включает коммерчески доступные формы, такие как ОКТ-3 (30 нг/мл, MACS

GMP CD3 pure, Miltenyi Biotech, Inc., San Diego, CA, USA) и муромонаб или их варианты, консервативные аминокислотные замены, гликоформы или биосимиляры.

Аминокислотные последовательности тяжелых и легких цепей муромонаба приведены в табл. 1 (SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28). Гибридома, способная продуцировать ОКТ-3, депонирована в American Type Culture Collection с присвоенным номером доступа ATCC CRL 8001. Гибридома, способная продуцировать ОКТ-3, также депонирована в European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) с присвоенным № по каталогу 86022706.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности муромонаба

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные аминокислотные символы)
SEQ ID NO: 27 Тяжелая цепь муромонаба	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTN Y 60 NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTLTVSSA 120 KTTAPSVYPL APVCGGTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTTLW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL 180 YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 300 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE 360 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
SEQ ID NO: 28 Легкая цепь муромонаба	QIVLTQSPA I MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH 60 FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFPPS 120 SEQLTSGGAS VVCFLNNFYF KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL 180 TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC 213

Термин "IL-2" (также обозначаемый в настоящем описании как "IL2") относится к Т-клеточному фактору роста, известному как интерлейкин-2, и включает все формы IL-2, в том числе формы человека и млекопитающих, консервативные аминокислотные замены, их гликоформы, биосимиляры и варианты. IL-2 описан, например, в Nelson, J. Immunol. 20041723983-88 и Malek, Annu. Rev. Immunol. 2008, 26, 453-79, раскрытия которых включены по ссылке в настоящее описание. Аминокислотная последовательность рекомбинантного IL-2 человека, пригодного для использования в изобретении, приведена в табл. 2 (SEQ ID NO: 3). Например, термин IL-2 охватывает человеческие, рекомбинантные формы IL-2, такие как альдеслейкин (пролейкин, доступен коммерчески у нескольких поставщиков во флаконах по 22 млн. МЕ на одно использование), а также форму рекомбинантного IL-2, коммерчески поставляемую CellGenix, Inc., Portsmouth, NH, USA (CELLGRO GMP) или ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (№ по каталогу CYT-209-b) и другие коммерческие эквиваленты других поставщиков. Альдеслейкин (дез-аланил-1, серин-125 IL-2 человека) представляет собой негликозилированную рекомбинантную форму IL-2 человека с молекулярной массой приблизительно 15 кДа. Аминокислотная последовательность альдеслейкина, пригодного для использования в изобретении, приведена в табл. 2 (SEQ ID NO: 30). Термин IL-2 также охватывает пегилированные формы IL-2, как раскрыто в настоящем описании, в том числе пегилированное IL2 пролекарственное средство NKTR-214, доступное в Nektar Therapeutics, South San Francisco, CA, USA. NKTR-214 и пегилированный IL-2, пригодные для использования в изобретении, описаны в публикации патентной заявки США № US 2014/0328791 A1 и публикации международной патентной заявки № WO 2012/065086 A1, раскрытия которых включены по ссылке в настоящее описание. Альтернативные формы конъюгированного IL-2, пригодного для использования в изобретении, опи-

саны в патентах США №№ 4766106, 5206344, 5089261 и 4902502, раскрытия которых включены по ссылке в настоящее описание. Составы IL-2, пригодные для использования в изобретении, описаны в патенте США № 6706289, раскрытие которого включено в настоящее описание посредством ссылки.

Как используют в настоящем описании, интерлейкины включают IL-2, IL-4, IL-7, IL-15 и IL-21. Образцовые последовательности этих интерлейкинов приведены в таблице 2 далее.

Таблица 2. Аминокислотные последовательности интерлейкинов

Идентификатор	последовательность (однобуквенные аминокислотные символы)
SEQ ID NO: 29	MARTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMLNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK
Рекомбинантный IL-2 человека (rhIL-2)	ATELKHLQCL 60 EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN 120 RWITFCQSII STLT 134
SEQ ID NO: 30 Альдеслейкин (Пролейкин®)	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE 60 ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGET TFMCEYADET ATIVEFLNRW 120 ITFSQSIIST LT 132
SEQ ID NO: 31 Рекомбинантный IL-4 человека (rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCAA TVLRQFYSHH 60 EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI 120 MREKYSKCSS 130
SEQ ID NO: 32 Рекомбинантный IL-7 человека (rhIL-7)	MDCDIEGKDG QYQSVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA 60 ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTIIL LNCTGQVKGR KPAALGEOQP TKSLEENKSL 120 KEQKKLNDLC FLKRLQEIK TCWNKILMGT KEH 153
SEQ ID NO: 33 Рекомбинантный IL-15 человека (rhIL-15)	MNWNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLELQV ISLESGDASI 60 HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS 115
SEQ ID NO: 34 Рекомбинантный IL-21 человека (rhIL-21)	MQDRHMIRMRL QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG 60 NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLLOKMIHQ 120 HLSRTHGSE DS 132

Термин "IL-4" (также обозначаемый в настоящем описании как "IL4") относится к цитокину, известному как интерлейкин 4, который продуцируют Т-клетки Th2 и эозинофилы, базофилы и тучные клетки. IL-4 регулирует дифференцировку наивных хелперных Т-клеток (клеток Th0) в Т-клетки Th2. Steinke and Borish, Respir. Res. 2001, 2, 66-70. При активации с помощью IL-4, Т-клетки Th2 впоследствии продуцируют дополнительный IL-4 в контуре положительной обратной связи. IL-4 также стимулирует пролиферацию В-клеток и экспрессию МНС II класса, а также индуцирует переключение класса на IgE и экспрессию IgG1 в В-клетках. Рекомбинантный IL-4 человека, пригодный для использования в изобретении, коммерчески доступен у нескольких поставщиков, в том числе ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (№ по каталогу CYT-211) и ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (рекомбинантный белок IL-15 человека, № по каталогу Gibco CTP0043). Аминокислотная последовательность рекомбинантного IL-4 человека, пригодного для использования в изобретении, приведена в табл. 2 (SEQ ID NO: 31).

Термин "IL-7" (также обозначаемый в настоящем описании как "IL7") относится к гликозилирован-

ному цитокину тканевого происхождения, известному как интерлейкин 7, который можно получать из стромальных и эпителиальных клеток, а также из дендритных клеток. Fry and Mackall, Blood 2002, 99, 3892-904. IL-7 может стимулировать развитие Т-клеток. IL-7 связывается с рецептором IL-7, гетеродимером, состоящим из α и общей γ цепи рецептора IL-7, который в ряду сигналов, важных для развития Т-клеток в тимусе и выживаемости на периферии. Рекомбинантный IL-4 человека, пригодный для использования в изобретении, коммерчески доступен у нескольких поставщиков, в том числе ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (№ по каталогу CYT-254) и ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (рекомбинантный белок IL-15 человека, № по каталогу Gibco PHC0071). Аминокислотная последовательность рекомбинантного IL-7 человека, пригодного для использования в изобретении, приведена в табл. 2 (SEQ ID NO: 32).

Термин "IL-15" (также обозначаемый в настоящем описании как "IL15") относится к Т-клеточному фактору роста, известному как интерлейкин 15, и включает все формы IL-2, в том числе формы человека и млекопитающих, консервативные аминокислотные замены, их гликоформы, биосимиляры и варианты. IL-15 описан, например, в Fehniger and Caligiuri, Blood 2001, 97, 14-32, раскрытие которого включено в настоящее описание посредством ссылки. IL-15 имеет общие β и γ сигнальные рецепторные субъединицы с IL-2. Рекомбинантный IL-15 человека представляет собой одну негликозилированную полипептидную цепь, содержащую 114 аминокислот (и N-концевой метионин), с молекулярной массой 12,8 кДа. Рекомбинантный IL-15 человека коммерчески доступен у нескольких поставщиков, в том числе ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (№ по каталогу CYT-230-b) и ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (рекомбинантный белок IL-15 человека, № по каталогу 34-8159-82). Аминокислотная последовательность рекомбинантного IL-15 человека, пригодного для использования в изобретении, приведена в табл. 2 (SEQ ID NO: 33).

Термин "IL-21" (также обозначаемый в настоящем описании как "IL21") относится к плеiotропному белку цитокина, известного как интерлейкин 21, и включает все формы IL-21, в том числе формы человека и млекопитающего, консервативные аминокислотные замены, их гликоформы, биосимиляры и варианты. IL-21 описан, например, в Spolski and Leonard, Nat. Rev. Drug. Disc. 2014, 13, 379-95, раскрытие которого включено в настоящее описание посредством ссылки. IL-21 в первую очередь продуцируют естественные киллерные Т-клетки и активированные CD4+ Т-клетки человека. Рекомбинантный IL-21 человека представляет собой одну негликозилированную полипептидную цепь, содержащую 132 аминокислоты, с молекулярной массой 15,4 кДа. Рекомбинантный IL-21 человека коммерчески доступен у нескольких поставщиков, в том числе ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (№ по каталогу CYT-408-b) и ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (рекомбинантный белок IL-21 человека, № по каталогу 14-8219-80). Аминокислотная последовательность рекомбинантного IL-21 человека, пригодного для использования в изобретении, приведена в табл. 2 (SEQ ID NO: 34).

"Заболевание" включает состояние здоровья животного, при котором животное не может поддерживать гомеостаз и при котором, если заболевание не улучшают, здоровье животного продолжает ухудшаться.

В отличие от этого, "нарушение" у животного включает состояние здоровья, при котором животное способно поддерживать гомеостаз, но при котором состояние здоровья животного является менее благоприятным, чем оно было бы в отсутствие нарушения. Оставаясь без лечения, нарушение не обязательно вызывает дальнейшее снижение состояния здоровья животного.

Заболевание или нарушение "облегчают", если снижают тяжесть симптома заболевания или нарушения, частоту, с которой пациент испытывает такой симптом, или и то и другое.

В отношении патентоспособных способов термин "опухоль" или "злокачественная опухоль" может представлять собой любую злокачественную опухоль, в том числе любую острую лимфоцитарную злокачественную опухоль, острый миелолейкоз, альвеолярную рабдомиосаркому, злокачественную опухоль кости, злокачественную опухоль головного мозга, злокачественную опухоль молочной железы, злокачественную опухоль ануса, анального канала или аноректума, злокачественную опухоль глаза, злокачественную опухоль внутрипеченочного желчного протока, злокачественную опухоль суставов, злокачественную опухоль шеи, желчного пузыря или плевры, злокачественную опухоль носа, носовой полости или среднего уха, злокачественную опухоль вульвы, хронический лимфоцитарный лейкоз, хроническую миелоидную злокачественную опухоль, злокачественную опухоль шейки матки, глиому, лимфому Ходжкина, злокачественную опухоль подглоточника, злокачественную опухоль почки, злокачественную опухоль гортани, злокачественную опухоль печени, злокачественную опухоль легких, озлокачественную мезотелиому, меланому, множественную миелому, злокачественную опухоль носоглотки, неходжкинскую лимфому, злокачественную опухоль яичников, злокачественную опухоль брюшины, сальника и брыжейки, злокачественную опухоль глотки, злокачественную опухоль предстательной железы, злокачественную опухоль прямой кишки, злокачественную опухоль почки, злокачественную опухоль кожи, злокачественную опухоль мягких тканей, злокачественную опухоль яичек, злокачественную опухоль щитовидной железы, злокачественную опухоль мочеточника, злокачественную опухоль мочевого пузыря и злокачественную опухоль пищеварительного тракта, такую как, например, злокачественная опухоль

пищевода, злокачественная опухоль желудка, злокачественная опухоль поджелудочной железы, злокачественная опухоль желудка, злокачественная опухоль тонкой кишки, желудочно-кишечная карциноидная опухоль, злокачественная опухоль ротовой полости, злокачественная опухоль ободочной кишки и гепатобилиарная злокачественная опухоль. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой меланому. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой метастатическую меланому.

Как используют в настоящем описании, термин "млекопитающее" относится к любому млекопитающему, включая в качестве неограничивающих примеров млекопитающих отряда Rodentia, таких как мыши и хомяки, и млекопитающих отряда Logomorpha, таких как кролики. В некоторых вариантах осуществления млекопитающие относятся к отряду Carnivora, в том числе кошачьим (кошки) и псовым (собаки). В некоторых вариантах осуществления млекопитающие относятся к отряду Artiodactyla, в том числе быкам (коровы) и свиньям (свиньи), или отряду Perissodactyla, в том числе лошадиные (лошади). Наиболее предпочтительно, чтобы млекопитающие относились к отряду приматов, Cebidae или "Simoids" (мартышки) или к отряду Anthropoids (человек и человекообразные обезьяны). В некоторых вариантах осуществления млекопитающим является человек.

Термин "регрессия", а также слова, происходящие от него, как используют в настоящем описании, не обязательно подразумевают 100% или полную регрессию. Точнее, существуют различные степени регрессии, среди которых специалист в данной области распознает имеющие потенциальную пользу или терапевтический эффект. В этом отношении, патентоспособные способы могут обеспечивать любое количество любого уровня регрессии злокачественной опухоли у млекопитающего. Кроме того, регрессия, обеспечиваемая с помощью патентоспособного способа, может включать регрессию одного или более состояний или симптомов заболевания, например, злокачественной опухоли. Также, для целей настоящего описания, "регрессия" может охватывать задержку начала заболевания или задержку начала симптома и/или задержку начала состояния при нем.

"Эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" композиции включает то количество композиции, которого достаточно для обеспечения положительного эффекта у субъекта, которому вводят композицию. "Эффективное количество" носителя для доставки включает то количество, которого достаточно для того, чтобы эффективно связывать или доставлять композицию.

"Кодирование" включает неотъемлемое свойство конкретных последовательностей нуклеотидов в полинуклеотиде, таком как ген, кДНК или мРНК, служить в качестве матриц для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах, которые имеют или определенную последовательность нуклеотидов (т.е. рРНК, тРНК и мРНК) или определенную последовательность аминокислот и биологические свойства, вытекающие из этого. Таким образом, ген кодирует белок, например, если транскрипция и трансляция мРНК, соответствующей этому гену, продуцирует белок в клетке или другой биологической системе. И кодирующую нить, нуклеотидная последовательность которой идентична последовательности мРНК и обычно приводится в списках последовательностей, и некодирующую нить, используемую в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, можно обозначать как кодирующую белок или другой продукт этого гена или кДНК.

Как используют в настоящем описании, "эндогенный" включает любой материал из или продуцируемый внутри организма, клетки, ткани или системы.

Как используют в настоящем описании, термин "экзогенный" включает любой материал, вводимый или продуцируемый снаружи организма, клетки, ткани или системы.

"Экспрессирующая кассета" включает любую конструкцию нуклеиновой кислоты, способную управлять экспрессией гена/кодирующей последовательности, представляющих интерес, которая функционально связана с промотором экспрессирующей кассеты. Такие кассеты можно конструировать в виде "вектора", "векторной конструкции", "экспрессирующего вектора" или "вектора переноса генов", чтобы переносить экспрессирующую кассету в целевые клетки. Таким образом, термин включает клонирующие и экспрессионные носители, а также вирусные векторы.

Как используют в настоящем описании, термин "фрагмент", как применяют к нуклеиновой кислоте или полипептиду, включает подпоследовательность более крупной нуклеиновой кислоты или полипептида. "Фрагмент" нуклеиновой кислоты может составлять по меньшей мере приблизительно 15 нуклеотидов в длину; например, по меньшей мере приблизительно от 50 нуклеотидов приблизительно до 100 нуклеотидов; по меньшей мере приблизительно от 100 приблизительно до 500 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно от 500 приблизительно до 1000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно от 1000 нуклеотидов приблизительно до 1500 нуклеотидов; или приблизительно от 1500 нуклеотидов приблизительно до 2500 нуклеотидов; или приблизительно 2500 нуклеотидов (и любое целое значение между ними). "Фрагмент" полипептида может составлять по меньшей мере приблизительно 15 аминокислот в длину; например, по меньшей мере приблизительно от 50 аминокислот приблизительно до 100 аминокислот; по меньшей мере приблизительно от 100 аминокислот до 500 аминокислот, по меньшей мере приблизительно от 500 приблизительно до 1000 аминокислот, по меньшей мере приблизительно от 1000 аминокислот приблизительно до 1500 аминокислот; или приблизительно от 1500 аминокислот приблизительно до 2500 аминокислот; или приблизительно 2500 аминокислот (и любое целое значение между ними).

Как используют в настоящем описании, термины "ген" и "рекомбинантный ген" включают молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие открытую рамку считывания, кодирующую полипептид. Такие природные аллельные вариации обычно могут вести к 1-5% вариативности в нуклеотидной последовательности данного гена. Альтернативные аллели можно идентифицировать посредством секвенирования гена, представляющего интереса, у нескольких различных индивидуумов. Это можно легко осуществлять с использованием зондов для гибридизации, чтобы идентифицировать один и тот же генетический локус у различных индивидуумов. Любые и все такие нуклеотидные вариации и получаемые аминокислотные полиморфизмы или вариации, которые являются результатом природной аллельной вариации и которые не изменяют функциональную активность, предусмотрены объемом изобретения.

"Гомологичный", как используют в настоящем описании, включает сходство последовательностей субъединиц между двумя полимерными молекулами, например, между двумя молекулами нуклеиновой кислоты, например, двумя молекулами ДНК или двумя молекулами РНК или между двумя полипептидными молекулами. Когда положение субъединицы в обеих из двух молекул занято одной и той же мономерной субъединицей, например, если положение в каждой из двух молекул ДНК занято аденином, тогда они гомологичны в этом положении. Гомология между двумя последовательностями является непосредственной функцией числа совпадающих или гомологичных положений, например, если половина (например, пять положений в полимере в 10 субъединиц в длину) положений в двух составных последовательностях гомологичны то две последовательности гомологичны на 50%, если 90% положений, например, 9 из 10, совпадают или гомологичны, две последовательности обладают гомологией 90%. В качестве примера, ДНК последовательности 5'-ATTGCC-3' и 5'-TATGGC-3' обладают гомологией 50%.

"Индукцибельная" экспрессия включает состояние, в котором продукт гена продуцирует живая клетка в ответ на присутствие сигнала в клетке.

Как используют в настоящем описании, "обучающий материал" включает публикацию, запись, диаграмму или любую другую среду выражения, которую можно использовать для того, чтобы сообщать применимость и/или использование соединения, композиции, вектора или системы доставки по настоящему раскрытию в наборе в соответствии с настоящим раскрытием, например, наборе для осуществления облегчения различных заболеваний или нарушений, перечисленных в настоящем описании. Необязательно, или альтернативно, обучающий материал может описывать один или более способов облегчения заболеваний или нарушений в клетке или ткани млекопитающего. Обучающий материал из набора по изобретению, например, можно прикреплять к контейнеру, который содержит идентифицированное соединение, композицию, вектор или систему доставки по изобретению, или поставлять вместе с контейнером, который содержит идентифицированное соединение, композицию, вектор или систему доставки. Альтернативно, обучающий материал можно поставлять отдельно от контейнера с целью совместного использования обучающего материала и соединения реципиентом.

Термин "нуклеиновая кислота" включает молекулы РНК или ДНК, которые имеют больше чем один нуклеотид в любой форме, включая одноцепочечную, двухцепочечную, олигонуклеотид или полинуклеотид. Термин "нуклеотидная последовательность" включает порядок нуклеотидов в олигонуклеотиде или полинуклеотиде в одноцепочечной форме нуклеиновой кислоты.

Под "конструкцией нуклеиновой кислоты" понимают последовательность нуклеиновой кислоты, которую сконструировали так, чтобы она содержала один или более функциональных блоков, не встречающихся в природе вместе. Примеры включают кольцевые, линейные, двухцепочечные, внехромосомные молекулы ДНК (плазмиды), космиды (плазмиды, содержащие последовательности COS из фага λ), вирусные геномы, содержащие не нативные последовательности нуклеиновой кислоты, и т.п.

Термин "функционально связанный", как используют в настоящем описании, включает полинуклеотид в функциональной связи со вторым полинуклеотид, например, одноцепочечный или двухцепочечный фрагмент нуклеиновой кислоты, содержащий два полинуклеотида, расположенные во фрагменте нуклеиновой кислоты таким образом, что по меньшей мере один из двух полинуклеотидов способен вызывать физиологический эффект, которым он отличается, при другом. В качестве примера, промотор, функционально связанный с кодирующей областью гена, способен содействовать транскрипции кодирующей области. Указанный порядок при обозначении функциональной связи не важен. Например, фразы: "промотор функционально связан с нуклеотидной последовательностью" и "нуклеотидная последовательность функционально связана с промотором" используют взаимозаменяемо в настоящем описании и считают эквивалентными. В некоторых случаях, когда нуклеиновая кислота, кодирующая желаемый белок, дополнительно содержит промоторную/регуляторную последовательность, промоторную/регуляторную последовательность располагают на 5'-конце кодирующей последовательности желаемого белка так, что она управляет экспрессией желаемого белка в клетке.

Термины "олигонуклеотид", "полинуклеотид" и "молекула нуклеиновой кислоты", используемые взаимозаменяемо в настоящем описании, относятся к полимерным формам нуклеотидов любой длины, будь то рибонуклеотиды или дезоксирибонуклеотиды. Таким образом, этот термин включает, но не ограничиваясь этим, одно-, двух- или многоцепочечные 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 нуклеотид-

ные основания. Остов полинуклеотида может содержать сахара и фосфатные группы (как обычно встречается в РНК или ДНК) или модифицированные или замещенные сахарные или фосфатные группы. Альтернативно, остов полинуклеотида может содержать полимер синтетических субъединиц, таких как фосфорамидиты и/или фосфотиоаты, и, таким образом, может представлять собой олигодезоксинуклеозидный фосфорамидатный или смешанный фосфорамидатный сложный фосфодифирный олигомер. Peyrottes et al. (1996) Nucl. Acids Res. 24:1841-1848; Chaturvedi et al. (1996) Nucl. Acids Res. 24:2318-2323. Полинуклеотид может содержать один или более L-нуклеозидов. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и аналоги нуклеотидов, и может прерываться ненуклеотидными компонентами. Если присутствуют, модификации в структуру нуклеотида можно вносить до или после сборки полимера. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и аналоги нуклеотидов, урацил, другие сахара и линкерные группы, такие как фторрибоза и тиоат, и нуклеотидные ветви. Последовательность нуклеотидов может прерываться ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид дополнительно можно модифицировать после полимеризации, например, посредством конъюгации с метящим компонентом. Модификации других типов, включенные в это определение, представляют собой кэп, замену одного или более встречаемых в природе нуклеотидов на аналог и введение средства прикрепления полинуклеотида к белкам, ионам металлов, метящим компонентам, другим полинуклеотидам или твердому носителю. Всякий раз, когда полинуклеотид или олигонуклеотид представлен последовательностью букв (в верхнем или нижнем регистре), такой как "ATGCCTG", понятно, что нуклеотиды идут в порядке 5'→3' слева направо и что "А" обозначает дезоксиаденозин, "С" обозначает дезоксицитидин, "G" обозначает дезоксигуанозин и "Т" обозначает тимидин, "I" обозначает дезоксиинозин, "U" обозначает уридин, если не указано иное или очевидно из контекста. Если не указано иное, конвенции о терминологии и нумерации атомов придерживаются того, что раскрыто в Strachan and Read, Human Molecular Genetics 2 (Wiley-Liss, New York, 1999). Полинуклеотиды могут быть одинарными, двойными или тройными, линейными или круглыми и могут быть любой длины. При обсуждении полинуклеотидов, последовательность или структура конкретного полинуклеотида может быть описана в настоящем описании в соответствии с конвенцией о предоставлении последовательности в направлении от 5' к 3'.

Термин "рекомбинантный", как применяют к полинуклеотиду, обозначает, что полинуклеотид представляет собой продукт различных комбинаций стадий клонирования, рестрикции или лигирования и других процедур, ведущих к конструкции, различающейся и/или несходной с полинуклеотидом, встречающимся в природе. Термины, соответственно, включают реплики исходной полинуклеотидной конструкции и потомство исходной вирусной конструкции.

Термин "связывающий лиганд 1 запрограммированной смерти 1 (PD-L1) белок" относится к полипептиду (например, слитому белку, scFV, максителу, антители и т.п.), который способен специфически связываться с белком лиганда 1 запрограммированной смерти 1 (PD-L1) (также известным как CD274 или B7-H1), экспрессируемым на поверхности клетки.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок", используемые взаимозаменяемо в настоящем описании, относятся к полимерной форме аминокислот любой длины, которая может включать кодируемые и не кодируемые аминокислоты, химически или биохимически модифицированные или дериватизированные аминокислоты, и полипептидам, имеющим модифицированный пептидный остов. Термин включает полипептидные цепи, модифицированные или дериватизированные любым образом, включая в качестве неограничивающих примеров гликозилирование, формилирование, замыкание кольца, ацетилирование, фосфорилирование и т.п. Термин включает встречаемые в природе пептиды, синтетические пептиды и пептиды, содержащие один или более аналогов аминокислот. Термин включает слитые белки, включая в качестве неограничивающих примеров белки, слитые с гетерологичной аминокислотной последовательностью, слияния с гетерологичными и гомологичными лидерными последовательностями, с N-концевыми остатками метионина или без них; иммунологически меченные белки; и т.п.

Термин "опухолеассоциированный антиген" представляет собой термин, хорошо известный в данной области, который относится к молекулам, которые дифференциально сверхэкспрессированы в опухолевых клетках относительно не злокачественных клеток из того же типа клеток. Как используют в настоящем описании, "опухолеассоциированный антиген" включает не только полные опухолеассоциированные антигены, которые могут быть экспрессированы на клеточной поверхности, но также их части (фрагменты), содержащие эпитоп, который распознают Т-клетки. Опухлеассоциированный антиген (ТАА) может представлять собой тот, который встречается в природе, или может представлять собой синтетическую версию ТАА, встречаемого в природе, или может представлять собой вариант ТАА, встречаемого в природе, например, вариант, который обладает усиленными иммуногенными свойствами. ТАА может представлять собой встречаемый в природе сверхэкспрессируемый белок или мутированный белок, экспрессируемый только в опухолевых клетках или других трансформированных клетках в опухолях.

Термин "промотор", как используют в настоящем описании, включает последовательность ДНК, функционально связанную с последовательностью нуклеиновой кислоты, подлежащей транскрипции, такой как последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая желаемую молекулу. В целом промотор располагают выше последовательности нуклеиновой кислоты, подлежащей транскрипции, и он предусмат-

ривает место для специфического связывания РНК-полимеразы и других факторов транскрипции.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используют взаимозаменяемо в настоящем описании, чтобы отослать к полимерам аминокислот любой длины. "Полипептиды", "белки" и "пептиды", кодируемые "полинуклеотидными последовательностями", включают полноразмерные нативные последовательности, как в случае встречаемых в природе белков, а также функциональные подпоследовательности, модифицированные формы или варианты последовательностей, при условии, что подпоследовательность, модифицированная форма или вариант сохраняет в некоторой степени функциональность нативного полноразмерного белка. В способах и использованиях, как раскрыто в настоящем описании, такие полипептиды, белки и пептиды, кодируемые полинуклеотидными последовательностями, могут, но не обязательно, быть идентичными дефективному эндогенному белку, или у которого экспрессия недостаточна или дефицит которого имеет место у млекопитающего, получающего лечение. Термины также охватывают модифицированный аминокислотный полимер; например, формирование дисульфидной связи, гликозилирование, липидизация, фосфорилирование, метилирование, карбоксилирование, дезамидирование, ацетилирование или конъюгация с метящим компонентом. Полипептиды, такие как антиангиогенные полипептиды, нейрорепрессивные полипептиды и т.п., при обсуждении в контексте доставки продукта гена млекопитающему субъекту, а также композиции для этого, относятся к соответствующему интактному полипептиду или любому их фрагменту или генетически сконструированному производному, сохраняющему желаемую биохимическую функцию интактного белка.

"Рекомбинантный полипептид" включает тот, который получают при экспрессии рекомбинантного полинуклеотида.

Термин "специфически связывает", как используют в настоящем описании, например, в отношении антитела/антигенсвязывающей области, включает антитело/антигенсвязывающую область, которые распознают конкретный антиген, но по существу не распознают или не связывают другие молекулы в образце. Например, антитело (например, scFV), которое специфически связывается с антигеном от одного вида, также может связываться с этим антигеном от одного или более других видов. Но такая межвидовая реакционная способность сама по себе не изменяет классификацию антитела в качестве специфического. В качестве другого примера, антитело, которое специфически связывается с антигеном, также может связываться с различными аллельными формами антигена. Однако такая перекрестная реакционная способность сама по себе не изменяет классификацию антитела в качестве специфического.

В некоторых случаях термин "специфическое связывание" можно использовать по отношению ко взаимодействию антитела, белка или пептида со второй химической частицей, чтобы обозначать, что взаимодействие зависит от присутствия конкретной структуры (например, антигенной детерминанты или эпитопа) на химической частице; например, антитело распознает и связывается с конкретной белковой структурой, а не с белками в целом. Если антитело обладает специфичностью к эпитопу "А", присутствие молекулы, содержащей эпитоп А, (или свободного меченого А) в реакции, содержащей меченный "А" и антитело, будет снижать количество меченого А, связанного с антителом.

Термин "синтетическое антитело", как используют в настоящем описании, включает антитело, которое создано с использованием технологии рекомбинантных ДНК, такое как, например, антитело, экспрессируемое с помощью бактериофага. Также термин следует толковать как обозначающий антитело, которое создано посредством синтеза молекулы ДНК, кодирующей антитело, и эта молекула ДНК экспрессирует белок антитела, или аминокислотной последовательности, определяющей антитело, где ДНК или аминокислотная последовательность получена с использованием технологии синтеза ДНК или аминокислотной последовательности, которая доступна и хорошо известна в данной области.

В настоящем описании в качестве термина используют "вариант", который включает последовательность нуклеиновой кислоты или пептидную последовательность, которая отличается по последовательности от эталонной последовательности нуклеиновой кислоты или пептидной последовательности, соответственно, но сохраняет важные биологические свойства эталонной молекулы. Изменения в последовательности варианта нуклеиновой кислоты могут не изменять аминокислотную последовательность пептида, кодируемого эталонной нуклеиновой кислотой, или может вести к заменам, добавлениям, делециям аминокислот, слияниям и усечениям. Изменения в последовательности пептидных вариантов обычно являются ограниченными или консервативными, с тем, чтобы последовательности эталонного пептида и варианта имели близкое сходство в целом и, во многих областях, были идентичными. Вариант и эталонный пептид могут отличаться в аминокислотной последовательности одной или более заменами, добавлениями, делециями в любой комбинации. Вариант нуклеиновой кислоты или пептида может представлять собой встречаемый в природе, например, аллельный вариант, или может представлять собой вариант, о котором не известно, что он встречается в природе. Не встречаемые в природе варианты нуклеиновых кислот и пептидов можно создавать посредством приемов мутагенеза или посредством прямого синтеза.

"Замена" является результатом замещения одной или более аминокислот или нуклеотидов на другие аминокислоты или нуклеотиды, соответственно, по сравнению с аминокислотной последовательностью или нуклеотидной последовательностью полипептида. Если замена является консервативной, аминокислота, которая замещена в полипептиде, имеет схожие структурные или химические свойства (на-

пример, заряд, полярность, гидрофобность и т.п.) с аминокислотой, которая ее заменяет. Консервативные замены встречаемых в природе аминокислот ("консервативные аминокислотные замены") обычно ведут к замене первой аминокислоты на вторую аминокислоту из той же группы, что и первая аминокислота, где примеры групп аминокислот представляют собой следующее: (1) кислые (отрицательно заряженные) аминокислоты, такие как аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; (2) основные (положительно заряженные) аминокислоты, такие как аргинин, гистидин и лизин; (3) нейтральные полярные аминокислоты, такие как глицин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин и глутамин; и (4) нейтральные неполярные аминокислоты, такие как аланин, лейцин, изолейцин, валин, пролин, фенилаланин, триптофан и метионин. В некоторых вариантах осуществления варианты полипептида могут иметь "неконсервативные" замены, где замещенная аминокислота отличается структурными и/или химическими свойствами.

"Делецию" определяют как изменение аминокислотной или нуклеотидной последовательности, в которой один или более аминокислотных или нуклеотидных остатков, соответственно, отсутствуют по сравнению с аминокислотной последовательностью или нуклеотидной последовательностью встречаемого в природе полипептида или полинуклеотида. В контексте полипептидной или полинуклеотидной последовательности делеция может включать делецию 2, 5, 10, вплоть до 20, вплоть до 30 или вплоть до 50 или больше аминокислотных или нуклеотидных остатков, с учетом длины модифицируемой полипептидной или полинуклеотидной последовательности.

"Инсерция" или "добавление" представляет собой то изменение в аминокислотной или нуклеотидной последовательности, которое ведет к добавлению одного или более аминокислотных или нуклеотидных остатков, соответственно, по сравнению с аминокислотной последовательностью или нуклеотидной последовательностью встречаемого в природе полипептида или полинуклеотида. "Инсерция" в целом относится к добавлению одного или более аминокислотных остатков в аминокислотную последовательность полипептида (или нуклеотидных остатков в полинуклеотид), тогда как "добавление" может представлять собой инсерцию или относиться к аминокислотным остаткам, добавленным на N- или C-конце полипептида (или нуклеотидным остаткам, добавленным на 5'- или 3'-конце полинуклеотида). В контексте полипептидной или полинуклеотидной последовательности, инсерция или добавление может составлять вплоть до 10, вплоть до 20, вплоть до 30 или вплоть до 50 или больше аминокислот (или нуклеотидных остатков).

"Выделенная" плазмиды, нуклеиновая кислота, вектор или другое вещество относится к препарату вещества, свободного от по меньшей мере некоторых других компонентов, которые присутствуют там, где вещество или схожее вещество встречается в природе или откуда его изначально получают. Таким образом, например, выделенное вещество можно получать с использованием приема очистки для обогащения его из исходной смеси. Обогащение можно измерять на абсолютной основе, такой как масса на объем раствора, или его можно измерять по отношению ко второму, потенциально мешающему веществу, присутствующему в исходной смеси. Возрастающее обогащение по вариантам осуществления данного изобретения является все более выделенным. Выделенную плазмиду, нуклеиновую кислоту, вектор или другое вещество в некоторых вариантах осуществления очищают, например, до чистоты приблизительно от 80% приблизительно до 90%, до чистоты по меньшей мере приблизительно 90%, до чистоты по меньшей мере приблизительно 95%, до чистоты по меньшей мере приблизительно 98 или до чистоты по меньшей мере приблизительно 99% или больше.

"Вектор" способен к переносу последовательностей генов в целевые клетки. Обычно "векторная конструкция", "экспрессирующий вектор" и "вектор переноса генов" обозначают любую конструкцию нуклеиновой кислоты, способную направлять экспрессию гена, представляющего интерес, и они могут переносить последовательности генов в целевые клетки, что можно выполнять посредством геномной интеграции всего или части вектора или временного или наследуемого поддержания вектора в виде внехромосомного элемента. Таким образом, термин включает клонирующие и экспрессионные носители, а также интегрирующие векторы.

Термин "регуляторный элемент", как используют в настоящем описании, включает нуклеотидную последовательность, которая управляет определенным аспектом экспрессии последовательностей нуклеиновой кислоты. Примеры регуляторных элементов иллюстративно включают энхансер, внутренний участок связывания рибосомы (IRES), интрон, участок начала репликации, сигнал полиаденилирования (pA), промотор, энхансер, последовательность терминации транскрипции и вышележащий регуляторный домен, который вносит вклад в репликацию, транскрипцию и/или посттранскрипционный процессинг последовательности нуклеиновой кислоты. В определенных случаях, регуляторные элементы также могут включать цис-регуляторные ДНК элементы, а также перемещающиеся элементы (TE). Средние специалисты в данной области способны выбирать и использовать эти и другие регуляторные элементы в экспрессионной конструкции с использованием не больше чем стандартных экспериментов. Экспрессионные конструкции можно создавать с использованием генетического рекомбинантного подхода или синтетически с использованием общеизвестных способов.

"Управляющий элемент" или "управляющая последовательность" представляет собой нуклеотидную последовательность, вовлеченную во взаимодействие молекул, вносящих вклад в функциональную регуляцию полинуклеотида, в том числе репликацию, дупликацию, транскрипцию, сплайсинг, трансля-

цию или разрушение полинуклеотида. Регуляция может влиять на частоту, скорость или специфичность процесса и может быть усиливающей или ингибирующей по природе. Управляющие элементы, известные в данной области, включают, например, транскрипционные регуляторные последовательности, такие как промоторы и энхансеры. Промотор представляет собой область ДНК, способную при определенных условиях связывать РНК-полимеразу и инициировать транскрипцию кодирующей области, обычно расположенной ниже (в направлении 3') от промотора.

"Функционально связанный" относится к близости генетических элементов, где элементы находятся в связи, которая позволяет им работать ожидаемым образом. Например, промотор функционально связан с кодирующей областью, если промотор помогает инициировать транскрипцию кодирующей последовательности. Могут иметь место промежуточные остатки между промотором и кодирующей областью при условии, что эта функциональная связь сохранена.

Термины "злокачественная опухоль", "новообразование", "опухоль" и "карцинома" используют взаимозаменяемо в настоящем описании, чтобы отослать к клеткам, которые проявляют относительно автономный рост так, что они проявляют фенотип неправильного роста, который отличается значимой утратой контроля над клеточной пролиферацией. Злокачественные клетки могут быть доброкачественными или озлокачественными. Примеры различных злокачественных опухолей включают, но не ограничиваясь этим, злокачественную опухоль молочной железы, злокачественную опухоль предстательной железы, злокачественную опухоль яичников, злокачественную опухоль шейки матки, злокачественную опухоль кожи, злокачественную опухоль поджелудочной железы, злокачественную опухоль толстой кишки, злокачественную опухоль почки, злокачественную опухоль печени, злокачественную опухоль головного мозга, лимфому, лейкоз, злокачественную опухоль легких и т.п.

Фраза "гомологичная опухоль" обозначает любую опухоль, состоящую из ткани того же типа, из которого она развивается. Дополнительно, опухоль может быть гомологичной для ТП, полученных из указанной опухоли. Например, опухоль меланомы может быть гомологичной для ТП, полученных из опухоли меланомы, и/или ТП, полученные из опухоли меланомы, можно использовать для того, чтобы лечить гомологичную опухоль меланомы, из которой они получены. В некоторых вариантах осуществления ТП, полученные из гомологичной опухоли, можно использовать для того, чтобы лечить гомологичную опухоль.

Под "индивидуумом" или "хозяйном" или "субъектом" или "пациентом" понимают любой млекопитающий субъект, для которого желательно диагностирование, лечение или терапия, в частности, человека. Другие субъекты могут включать крупный рогатый скот, собак, кошек, морских свинок, кроликов, крыс, мышей, лошадей и так далее.

Как используют в настоящем описании, термин "выделенное", когда используют в контексте выделенного соединения, относится к соединению, представляющему интерес, которое находится в окружении, отличающемся от того, в котором соединение встречается в природе. Под "выделенным" понимают, что включены соединения, находящиеся в образцах, которые по существу обогащены по соединению, представляющему интерес, и/или в которых соединение, представляющее интерес, частично или в значительной степени очищено.

Как используют в настоящем описании, термин "по существу чистое" относится к соединению, которое удаляют из его естественного окружения и которое по меньшей мере на 60% свободно, на 75% свободно или на 90% свободно от других компонентов, с которыми оно ассоциировано в природе.

Приемы определения "идентичности последовательностей" нуклеиновых кислот и аминокислот известны в данной области. Обычно такие приемы включают определение нуклеотидной последовательности мРНК для гена и/или определение аминокислотной последовательности, кодируемой им, и сравнение этих последовательностей со второй нуклеотидной или аминокислотной последовательностью. В целом, "идентичность" относится к точному соответствию нуклеотид-нуклеотид или аминокислота-аминокислота в двух полинуклеотидных или полипептидных последовательностях, соответственно. Две или больше последовательностей (полинуклеотидных или аминокислотных) можно сравнивать посредством определения их "процента идентичности". Процент идентичности двух последовательностей, будь то последовательности нуклеиновых кислот или аминокислот, представляет собой число точных совпадений между двумя выровненными последовательностями, деленное на длину более коротких последовательностей и умноженное на 100.

Приблизительное выравнивание последовательностей нуклеиновых кислот предоставляют с помощью алгоритма локальной гомологии Smith and Waterman, *Advances in Applied Mathematics*, 2:482-489 (1981). Этот алгоритм можно применять к аминокислотным последовательностям с использованием матрицы замен, разработанной Dayhoff, *Atlas of Protein Sequences and Structure*, ред. M.O. Dayhoff, 5 suppl. 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., USA, и нормализованной исследователем Gribskov, *Nucl. Acids Res.* 14(6):6745-6763 (1986).

Пример реализации этого алгоритма для определения процента идентичности последовательности предоставлен Genetics Computer Group (Madison, WI) в прикладной программе "BestFit". Параметры по умолчанию для этого способа описаны в Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, версия 8 (1995) (доступно в Genetics Computer Group, Madison, WI). Другой способ установления процента иден-

точности в контексте настоящего изобретения состоит в использовании пакета программ MPSRCH, авторские права на который принадлежат University of Edinburgh, разработка John F. Collins и Shane S. Sturrok, и который распространяет IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). В этом наборе пакетов можно использовать алгоритм Smith-Waterman, где параметры по умолчанию используют для оценочной таблицы (например, штраф за открытие пропуска - 12, штраф за продолжение пропуска - 1 и пропуск - 6). По генерируемым данным, значение "Match" отражает "идентичность последовательностей". Другие подходящие программы для вычисления процента идентичности или сходства между последовательностями в целом известны в данной области, например, другой программой выравнивания является BLAST, используемый с параметрами по умолчанию. Например, BLASTN и BLASTP можно использовать с использованием следующих параметров по умолчанию: genetic code=standard; filter=none; strand=both; cut-off=60; expect=10; Matrix=BLOSUM62; Descriptions=50 sequences; sort by=HIGH SCORE; Databases=non-redundant, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS translations+Swiss protein+Spupdate+PIR. Подробности об этих программах можно найти в интернете по адресу <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Альтернативно, в контексте полинуклеотидов, гомологий можно определять посредством гибридизации полинуклеотидов в условиях, которые позволяют формировать стабильные дуплексы между гомологичными областями, после чего следует расщепление с использованием нуклеазы (нуклеаз) с одноцепочечной специфичностью и определение размера расщепленных фрагментов.

Две ДНК или две полипептидные последовательности "по существу гомологичны" друг другу, когда последовательности проявляют по меньшей мере приблизительно 80-85%, по меньшей мере приблизительно 85-90%, по меньшей мере приблизительно 90-95% или по меньшей мере приблизительно 95-98% идентичность последовательностей на протяжении определенной длины молекул, как определяют с использованием вышеуказанных способов. Как используют в настоящем описании, по существу гомологичные также относятся к последовательностям, демонстрирующим полную идентичность с точно определенной ДНК или полипептидной последовательностью. Последовательности ДНК, которые по существу гомологичны, можно идентифицировать в эксперименте гибридизации по Саузерну, например, при строгих условиях, как определено для этой конкретной системы. Специалисты в данной области знают об определении подходящих условий гибридизации. См., например, Sambrook and Russel, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3-е изд., (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Первый полинуклеотид "получают из" второго полинуклеотида, если он имеет ту же или по существу ту же нуклеотидную последовательность, что и область второго полинуклеотида, его кДНК, его комплементов, или если он демонстрирует идентичность последовательностей, как описано выше. Этот термин не обозначает, что необходимо или подразумевается, что полинуклеотид нужно получать из указанного источника (несмотря на то, что такое включено), а скорее можно получать любым подходящим способом.

Первый полипептид (или пептид) "получают из" второго полипептида (или пептида), если (i) его кодирует первый полинуклеотид, полученный из второго полинуклеотида, или (ii) он демонстрирует идентичность последовательностей со вторыми полипептидами, как описано выше. Этот термин не обозначает, что необходимо или подразумевается, что полипептид нужно получать из указанного источника (несмотря на то, что такое включено), а скорее можно получать любым подходящим способом.

Термин "в комбинации с", как используют в настоящем описании, относится к использованию, где, например, первую терапию вводят в течение всего курса введения второй терапии; где первую терапию вводят в течение определенного периода времени, который перекрывается со введением второй терапии, например, где введение первой терапии начинают перед введением второй терапии и введение первой терапии заканчивают перед завершением введения второй терапии; где введение второй терапии начинают перед введением первой терапии и введение второй терапии заканчивают перед завершением введения первой терапии; где введение первой терапии начинают перед началом введения второй терапии и введение второй терапии завершают перед завершением введения первой терапии; где введение второй терапии начинают перед началом введения первой терапии и введение первой терапии завершают перед завершением введения второй терапии. По существу, "в комбинации" также может относиться к схеме, включающей введение двух или больше терапий. "В комбинации с", как используют в настоящем описании, также относится ко введению двух или больше терапий, которые можно вводить в одном и том же или различных составах, через один и тот же или различные пути и в дозированной форме одного и того же или различных типов.

Термины "лечение", "лечащий", "лечить" и т.п. относятся к достижению желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть профилактическим в терминах полного или частичного предотвращения заболевания или его симптома и/или может быть терапевтическим в терминах частичного или полного излечения заболевания и/или нежелательного эффекта, свойственного заболеванию. "Лечение", как используют в настоящем описании, охватывает любое лечение заболевания у млекопитающих, в частности у человека, и включает (а) предотвращение возникновения заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, но которого еще не диагностировали в качестве имеющего его; (b) ингибирование заболевания, т.е. торможение его развития или прогрессирования; и (с) облегчение заболевания, т.е. обеспечение регрессии заболевания и/или облегчение одного

или более симптомов заболевания. "Лечение" также обозначает, что охвачена доставка средства для того, чтобы обеспечивать фармакологический эффект, даже в отсутствие заболевания или состояния. Например, "лечение" охватывает доставку композиции, которая может вызывать иммунный ответ или придавать иммунитет в отсутствие патологического состояния, например, в случае вакцины.

Любые и все публикации (включая патенты и публикации патентных заявок), указанные в настоящем описании, включены в настоящее описание посредством ссылки для того, чтобы раскрывать и описывать способы и/или материалы, в связи с которыми процитированы публикации.

Публикации, рассмотренные в настоящем описании, предоставлены для их раскрытия прежде даты подачи настоящей заявки. Кроме того, приведенные даты публикаций могут отличаться от актуальных дат публикаций, что может требовать независимого подтверждения. В той мере, в которой публикации могут описывать определение, которое противоречит с явным или неявным определением или раскрытием по настоящему раскрытию, определение или раскрытие по настоящему раскрытию имеет решающее значение.

Как увидят специалисты в данной области по прочтении этого раскрытия, каждый из индивидуальных вариантов осуществления, описанных и проиллюстрированных в настоящем описании, имеет дискретные компоненты и признаки, которые можно легко отделять от или комбинировать с признаками любых других нескольких вариантов осуществления, не отступая от сущности и объема настоящего изобретения. Любой изложенный способ можно осуществлять в изложенном порядке событий или в любом другом порядке, который логически возможен.

Композиции

Белки (например, антитела), которые специфически связываются с PD-L1.

Предусмотрены белки (например, антитела), которые специфически связываются с PD-L1, нуклеиновые кислоты, кодирующие белки, и клетки, которые содержат рассматриваемый белок и/или нуклеиновую кислоту, кодирующую рассматриваемый белок. На всем протяжении этого раскрытия "белок, который специфически связывается с PD-L1", который содержит антигенсвязывающую область, как раскрыто в настоящем описании, также обозначают как "связывающий PD-L1 белок".

Предоставлены два новых рекомбинантных антитела (обозначаемые в настоящем описании как "38A1" и "19H9"), оба они специфически связываются с лигандом запрограммированной смерти 1 человека (PD-L1). PD-L1 человека, доступ NCBI NP_054862 (версия NP_054862.1 GI:7661534), представляет собой белок из 290 а.к., который имеет аминокислотную последовательность (которая содержит предполагаемый сигнальный пептид в а.к. 1-18 и эктодомен в аминокислотах 19-238):

```
MRI FAVFI FMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEM
EDKNI IQFVHG EEDLKVQHSSYRQRARLLKDKQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADY
KRITVKVNAPYNKINQRILVVDVPTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSDDHQVLSGKTTTNSKRE
EKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPLELPLAHPNERTHLVILGAILLCL
GVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET (SEQ ID NO: 21)
```

PD-L1 также известен как CD274 и B7-H1 и экспрессирован на поверхности клеток, например опухолевых клеток.

Подробности о последовательностях, в том числе последовательностях CDR, и дополнительная информация, связанная с антителами 38A1 и 19H9, представлены на фиг. 7. По существу, в некоторых случаях рассматриваемый белок, который специфически связывается с PD-L1, имеет антигенсвязывающую часть, которая содержит первый полипептид, который содержит 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 2-4 (CDR легкой цепи L1, L2 и L3 соответственно из scFV 38A1), и второй полипептид, который содержит 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 6-8 (CDR тяжелой цепи H1, H2 и H3 соответственно из scFV 38A1). В некоторых случаях рассматриваемый белок, который специфически связывается с PD-L1, имеет антигенсвязывающую часть, которая содержит первый полипептид, который содержит 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 2-4 (CDR легкой цепи L1, L2 и L3 соответственно из scFV 38A1), и второй полипептид, который содержит 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 6-8 (CDR тяжелой цепи H1, H2 и H3 соответственно из scFV 38A1), за тем исключением, что первый и/или второй полипептид могут содержать одну или более консервативных аминокислотных замен по отношению к точно определенным номерам SEQ ID до тех пор, пока белок специфически связывается с PD-L1. В некоторых случаях первый и/или второй полипептид могут содержать две или меньше (например, одну или меньше) консервативных аминокислотных замен в каждом аминокислотном сегменте, которые соответствуют точно определенным номерам SEQ ID до тех пор, пока белок специфически связывается с PD-L1. Например, такой рассматриваемый белок в некоторых случаях может содержать две или меньше (например, одну или меньше) консервативных аминокислотных замен в каждой CDR.

В некоторых случаях первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1 (легкая цепь 38A1), и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5 (тяжелая цепь 38A1) (например, см. фиг. 7). В некоторых случа-

ях первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5, за тем исключением, что первый и/или второй полипептид может содержать одну или более консервативных аминокислотных замен по отношению к точно определенным номерам SEQ ID до тех пор, пока белок специфически связывается с PD-L1. В некоторых случаях первый и/или второй полипептид может содержать две или меньше (например, одну или меньше) консервативных аминокислотных замен в каждом аминокислотном сегменте, которые соответствуют точно определенным номерам SEQ ID до тех пор, пока белок специфически связывается с PD-L1. Например, такой рассматриваемый белок в некоторых случаях может содержать две или меньше (например, одну или меньше) консервативных аминокислотных замен в каждой CDR. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит CDR, приведенные в SEQ ID NO: 2, 3 и 4, и где белок специфически связывается с PD-L1. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид содержит CDR, приведенные в SEQ ID NO: 6, 7 и 8, и где белок специфически связывается с PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1.

Легкая цепь - антитело 38A1.

```
SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGRKIVHWYQQRPGQAPVLVIYYDTRPAGIPE
RFSGSN SGNMATLTISTVAGDEADYYCQVWDTGSDHVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 1)
CDR1 (CDR-L1) : NIGRKI (SEQ ID NO: 2)
CDR2 (CDR-L2) : YDT (SEQ ID NO: 3)
CDR3 (CDR-L3) : QVWDTGSDHVV (SEQ ID NO: 4)
```

Тяжелая цепь - антитело 38A1.

```
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISGSGGTTY
YADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRVEDTAVYYCAKDWFRSSSPDAFDIWIWQGTITVTVSA
(SEQ ID NO: 5)
CDR1 (CDR-H1) : GFTFSNYA (SEQ ID NO: 6)
CDR2 (CDR-H2) : ISGSGGTT (SEQ ID NO: 7)
CDR3 (CDR-H3) : AKDWFRSSSPDAFDI (SEQ ID NO: 8)
```

В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или подающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или подающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3).

В некоторых случаях, рассматриваемый белок, который специфически связывается с PD-L1, имеет антигенсвязывающую часть, которая содержит первый полипептид, который содержит 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 10-12 (CDR легкой цепи L1, L2 и L3, соответственно, из scFV 19H9), и второй полипептид, который содержит 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 14-16 (CDR тяжелой цепи H1, H2 и H3 соответственно из scFV 19H9).

В некоторых случаях, рассматриваемый белок, который специфически связывается с PD-L1, имеет антигенсвязывающую часть, которая содержит первый полипептид, который содержит 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 10-12 (CDR легкой цепи L1, L2 и L3 соответственно из scFV 19H9), и второй полипептид, который содержит 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 14-16 (CDR тяжелой цепи H1, H2 и H3 соответственно из scFV 19H9), за тем исключением, что первый и/или второй полипептид может содержать одну или более консервативных аминокислотных замен по отношению к точно определенным номерам SEQ ID до тех пор, пока белок специфически связывается с PD-L1. В некоторых случаях, первый и/или второй полипептид может содержать две или меньше (например, одну или меньше) консервативных аминокислотных замен в каждом аминокислотном сегменте, которые соответствуют точно определенным номерам SEQ ID до тех пор, пока белок специфически связывается с PD-L1. Например, такой рассматриваемый белок в некоторых случаях может содержать две или меньше (например, одну или меньше) консервативных аминокислотных замен в каждой CDR. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит CDR, приведенные в SEQ ID NO: 10, 11 и 12, и где белок специфически связывается с PD-L1. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид содержит CDR, приведенные в SEQ ID NO: 14, 15 и 16, и где белок специфически связывается с PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1.

Легкая цепь - антитело 19H9.

NFMLTQPHSVSESIGKTVTISCTGSSSGSIARKFVQWYQQRPGSSPTTVIYENNRPSGV

SDRFSG SIGSSNSASLTISGLKTEADYQCQSYDSSNVVFGGGTKVTVL (SEQ ID NO: 9)

CDR1 (CDR-L1): SGSIARKF (SEQ ID NO: 10)

CDR2 (CDR-L2): ENN (SEQ ID NO: 11)

CDR3 (CDR-L3): QSYDSSNVV (SEQ ID NO: 12)

Тяжелая цепь - антитело 19H9.

QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSGINTAGDTHY

PESVKG

RFTISRDNARNSLNLQMNSLRAEDTAVYYCVRERVEREYSGYDAFDIWGQGTITVTVSA

(SEQ ID NO: 13)

CDR1 (CDR-H1): GFTFSSYS (SEQ ID NO: 14)

CDR2 (CDR-H2): INTAGDT (SEQ ID NO: 15)

CDR3 (CDR-H3): VRERVEREYSGYDAFDI (SEQ ID NO: 16)

В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9 (легкая цепь 19H9), и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13 (тяжелая цепь 19H9) (например, см. фиг. 7). В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, на 90%, 95% или 98% идентичную аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 9 (легкая цепь 19H9), и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, на 90%, 95% или 98% идентичную аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 13 (тяжелая цепь 19H9). В некоторых случаях первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9, и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, за тем исключением, что первый и/или второй полипептид может содержать одну или более консервативных аминокислотных замен по отношению к точно определенным номерам SEQ ID до тех пор пока белок специфически связывается с PD-L1. В некоторых случаях первый и/или второй полипептид может содержать две или меньше (например, одну или меньше) консервативных аминокислотных замен в каждом аминокислотном сегменте, которые соответствуют точно определенным номерам SEQ ID до тех пор, пока белок специфически связывается с PD-L1. Например, такой рассматриваемый белок в некоторых случаях может содержать две или меньше (например, одну или меньше) консервативных аминокислотных замен в каждой CDR.

В некоторых вариантах осуществления рассматриваемый белок, который специфически связывается с PD-L1, представляет собой одноцепочечное антитело (scFv) (рассмотрено выше). По существу, в некоторых случаях, рассматриваемый белок, который специфически связывается с PD-L1, представляет собой scFv, и первый и второй полипептиды антигенсвязывающей части, как описано выше (например, в этом разделе), сливаются друг с другом (и, следовательно, они являются частью одного и того же полипептида). Примеры подходящих scFv включают, но не ограничиваясь этим, то, что приведено в SEQ ID NO: 17 и 19 (см. фиг. 7). В некоторых случаях, первый и второй полипептиды scFv отделяют друг от друга через линкер (например, гибкий линкер). Различные линкеры известны специалисту в данной области, и можно использовать любой удобный линкер. Гибкий линкер может содержать, например, аминокислот-

ную последовательность для шарнирной области, которую получают из тяжелой цепи иммуноглобулина. Гибкий линкер можно располагать, например, между антигенсвязывающей частью (антигенсвязывающим доменом) антитела (например, scFv) и Fc доменом иммуноглобулина. В данной области известны различные гибкие линкеры, в том числе, например, гибкие линкеры, содержащие одну или более аминокислот Gly, Ser, Asn и/или Asp. В некоторых вариантах осуществления гибкий линкер представляет собой GGGGS. В некоторых вариантах осуществления гибкий линкер представляет собой (GGGGS)*n* (SEQ ID NO: 35), где *n* представляет собой целое между 1 и 10. В некоторых вариантах осуществления гибкий линкер представляет собой GGGGS. В некоторых вариантах осуществления гибкий линкер представляет собой GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 36). В некоторых вариантах осуществления гибкий линкер представляет собой GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37). В некоторых вариантах осуществления гибкий линкер представляет собой GGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 38). В некоторых вариантах осуществления гибкий линкер представляет собой GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 39). В некоторых вариантах осуществления гибкий линкер содержит С-концевые Ala и Pro (AP). В некоторых вариантах осуществления гибкий линкер представляет собой GGGSGG GSGGGGSGAP (SEQ ID NO: 40).

Гибкие линкеры для scFv из SEQ ID NO: 17 и 19 выделены полужирным начертанием с подчеркиванием на фиг. 7. В некоторых случаях рассматриваемый белок, который специфически связывается с PD-L1, содержит аминокислотную последовательность, обладающую 80% или большей идентичностью последовательностей (например, 85% или больше, 90% или больше, 95% или больше, 98% или больше, 99% или больше или 100% идентичностью последовательностей) с аминокислотной последовательностью, приведенной в любой из SEQ ID NO: 17 и 19 (например, см. фиг. 7).

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит следующую последовательность:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISGSGGTTY
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCAKDWFRSSSPDAFDIWGQGTTVTVSAG
GGGSGGGSGGGSGGAPSIVLTQPPSVSVAPGQTARITCGNNIGRKIVHWYQQRPGQAPVLLVI
YYDTRPAGIPERFSGSNSGMMATLTISTVAGDEADYYCQVWDTGSDHVVFGGGTKLTVL
 (SEQ ID NO: 17).

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит следующую последовательность:

QVQLQESGGGLVQPKGGSLRLSCAASGFTFSYSMNWVRQAPGKLEWVSGINTAGDTHY
PESVKGRFTISRDNARNLNLQMNSLRAEDTAVYYCVREREREYSGYDAFDIWGQGTTVTVSA
GGGSGGGSGGGSGGAPNFMILTQPHSVSESLGKTVTISCTGSSGSIARKFVQWYQQRPGSSPT
TVIYENNQRPSGVSDRFSGSIGSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSNVVFGGGTKVTVL
 (SEQ ID NO: 19).

В некоторых вариантах осуществления рассматриваемый белок, который специфически связывается с PD-L1 (например, scFv) сливаются непосредственно или через линкер с Fc доменом (или его фрагментом) (например, Fc IgG1, Fc IgG2, Fc IgG3, Fc IgG4 или его фрагмент), чтобы предоставлять макситело. В некоторых случаях Fc представляет собой Fc домен IgG1. В некоторых случаях Fc домен IgG1 имеет последовательность

CPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMetISRTPQVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDNLGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREP
QVYTLPPSQEEMetTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS
RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMetHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO: 22)

В некоторых вариантах осуществления Fc представляет собой Fc домен IgG4. В некоторых случаях, Fc домен IgG4 имеет последовательность

CPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMetISRTPQVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDNLGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREP
QVYTLPPSQEEMetTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS
RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMetHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO: 23)

В некоторых вариантах осуществления рассматриваемый белок, который специфически связывается с PD-L1, представляет собой гуманизованное антитело. В некоторых случаях, рассматриваемый белок, который специфически связывается с PD-L1, представляет собой scFv (например, как описано выше), слитый с Fc доменом (или его фрагментом) (например, Fc IgG1, Fc IgG2, Fc IgG3, Fc IgG4 или его фрагмент). В некоторых случаях рассматриваемый белок, который специфически связывается с PD-L1, содержит аминокислотную последовательность, обладающую 80% или большей идентичностью последовательностей (например, 85% или большей, 90% или большей, 95% или большей, 98% или большей, 99% или большей или 100% идентичностью последовательностей) с аминокислотной последова-

тельностью, приведенной в любой одной из SEQ ID NO: 18 и 20 (например, см. фиг. 7).

В некоторых вариантах осуществления рассматриваемый белок, который специфически связывается с PD-L1, содержит

```
MGSTAILALLLAVLQGVSAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQA
PGKGLEWVSTISGSGGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRVEDTAVYYCAKDWFRSS
SPDAFDIWGQGTTVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSGAPSYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIG
RKIVHWYQQRPGQAPVLVIYYDTRPAGIPERFSGSNSGNMATLTI STVGAGDEADYYCQVWDT
GSDHVVVFGGGTKLTVLGPRANFVYKSGPRPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK (SEQ ID NO: 18) .
```

В некоторых вариантах осуществления рассматриваемый белок, который специфически связывается с PD-L1, содержит

```
MGSTAILALLLAVLQGVSAQVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQA
PGKGLEWVSGINTAGDTHYPESVKGRFTISRDNARNSLNLQMNLSRAEDTAVYYCVRERVEREY
SGYDAFDIWGQGTTVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSGAPNFMLTQPHSVSESLGKTVTISCTGSSG
SIARKFVQWYQQRPGSSPTTVIYENNRPSGVSDRFGSIGSSSNSASLTISGLKTEDEADYYC
QSYDSSNVVFGGGTKVTVLGPRANFVYKSGPRPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK (SEQ ID NO: 20) .
```

Рассматриваемый связывающий PD-L1 белок (например, scFv) можно сливать с партнером слияния. Примеры партнеров слияния для рассматриваемого связывающего PD-L1 белка (например, scFv) включают, но не ограничиваясь этим: (а) лиганд для рецептора активации NK (например, эктодомен ULBP1), (b) Fc домен любого иммуноглобулина человека (например, IgG4 или IgG1) и их варианты (например, мономерный мутант шарнира, FcR-связывающий мутант), (с) самодимеризующийся белок (например, белок с лейциновой молнией), (d) домены 3 и 4 (3/4) CD4 человека и (е) карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина человека (hCG).

Образцовые последовательности вышеуказанных партнеров слияния представляют собой следующее и включают самодимеризующиеся белки с лейциновыми молниями, домены 3 и 4 (3/4) CD4 человека и карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина человека (hCG).

В некоторых вариантах осуществления самодимеризующийся белок с лейциновой молнией содержит

```
RSGSSRMetKQIEDKIEEILSKIYHENEIARIKKLIGERGTSSRG (SEQ ID NO: 24)
```

В некоторых вариантах осуществления домены 3 и 4 (3/4) CD4 человека содержат

```
ASSIVYKKEGEQVEFSFPLAFTVEKLTGSGELWWQAERASSKSWITFDLKNKEVSVKR
VTQDPKLQMetGKKLPLHLTLPQALPQYAGSGLTLALEAKTGKLNQEVNLVVMetRATQLQKN
LTCEVWGPTSPKLMetLSLKLENKEAKVSKREKAVWVLNPEAGMetWQCLLSDSGQVLLLESNIK
VL (SEQ ID NO: 25)
```

В некоторых вариантах осуществления карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина человека (hCG) содержит

```
SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 26)
```

Свойства и совместные композиции связывающего PD-L1 белка В некоторых вариантах осуществления описанные композиции и способы включают ингибитор PD-1, который связывает PD-1 человека с K_D приблизительно 100 пМ или меньше, связывает PD-1 человека с K_D приблизительно 90 пМ или меньше, связывает PD-1 человека с K_D приблизительно 80 пМ или меньше, связывает PD-1 человека с K_D приблизительно 70 пМ или меньше, связывает PD-1 человека с K_D приблизительно 60 пМ или меньше, связывает PD-1 человека с K_D приблизительно 50 пМ или меньше, связывает PD-1 человека с K_D приблизительно 40 пМ или меньше, связывает PD-1 человека с K_D приблизительно 30 пМ или меньше, связывает PD-1 человека с K_D приблизительно 20 пМ или меньше, связывает PD-1 человека с K_D приблизительно 10 пМ или меньше или связывает PD-1 человека с K_D приблизительно 1 пМ или меньше.

В некоторых вариантах осуществления описанные композиции и способы включают ингибитор PD-

1, который связывается с PD-1 человека с $k_{\text{ассоц.}}$ приблизительно $7,5 \times 10^5$ 1/М×с или быстрее, связывается с PD-1 человека с $k_{\text{ассоц.}}$ приблизительно $7,5 \times 10^5$ 1/М×с или быстрее, связывается с PD-1 человека с $k_{\text{ассоц.}}$ приблизительно 8×10^5 1/М×с или быстрее, связывается с PD-1 человека с $k_{\text{ассоц.}}$ приблизительно $8,5 \times 10^5$ 1/М×с или быстрее, связывается с PD-1 человека с $k_{\text{ассоц.}}$ приблизительно 9×10^5 1/М×с или быстрее, связывается с PD-1 человека с $k_{\text{ассоц.}}$ приблизительно $9,5 \times 10^5$ 1/М×с или быстрее или связывается с PD-1 человека с $k_{\text{ассоц.}}$ приблизительно 1×10^6 1/М×с или быстрее.

В некоторых вариантах осуществления описанные композиции и способы включают ингибитор PD-1, который связывается с PD-1 человека с $k_{\text{диссоц.}}$ приблизительно 2×10^{-5} 1/с или медленнее, связывается с PD-1 человека с $k_{\text{диссоц.}}$ приблизительно $2,1 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с PD-1 человека с $k_{\text{диссоц.}}$ приблизительно $2,2 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с PD-1 человека с $k_{\text{диссоц.}}$ приблизительно $2,3 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с PD-1 человека с $k_{\text{диссоц.}}$ приблизительно $2,4 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с PD-1 человека с $k_{\text{диссоц.}}$ приблизительно $2,5 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с PD-1 человека с $k_{\text{диссоц.}}$ приблизительно $2,6 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее или связывается с PD-1 человека с $k_{\text{диссоц.}}$ приблизительно $2,7 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с PD-1 человека с $k_{\text{диссоц.}}$ приблизительно $2,8 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с PD-1 человека с $k_{\text{диссоц.}}$ приблизительно $2,9 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, или связывается с PD-1 человека с $k_{\text{диссоц.}}$ приблизительно 3×10^{-5} 1/с или медленнее.

В некоторых вариантах осуществления описанные композиции и способы включают ингибитор PD-1, который блокирует или ингибирует связывание PD-L1 человека или PD-L2 человека с PD-1 человека с IC_{50} приблизительно 10 нМ или меньше, блокирует или ингибирует связывание PD-L1 человека или PD-L2 человека с PD-1 человека с IC_{50} приблизительно 9 нМ или меньше, блокирует или ингибирует связывание PD-L1 человека или PD-L2 человека с PD-1 человека с IC_{50} приблизительно 8 нМ или меньше, блокирует или ингибирует связывание PD-L1 человека или PD-L2 человека с PD-1 человека с IC_{50} приблизительно 7 нМ или меньше, блокирует или ингибирует связывание PD-L1 человека или PD-L2 человека с PD-1 человека с IC_{50} приблизительно 6 нМ или меньше, блокирует или ингибирует связывание PD-L1 человека или PD-L2 человека с PD-1 человека с IC_{50} приблизительно 5 нМ или меньше, блокирует или ингибирует связывание PD-L1 человека или PD-L2 человека с PD-1 человека с IC_{50} приблизительно 4 нМ или меньше, блокирует или ингибирует связывание PD-L1 человека или PD-L2 человека с PD-1 человека с IC_{50} приблизительно 3 нМ или меньше, блокирует или ингибирует связывание PD-L1 человека или PD-L2 человека с PD-1 человека с IC_{50} приблизительно 2 нМ или меньше, или блокирует или ингибирует связывание PD-L1 человека или PD-L2 человека с PD-1 человека с IC_{50} приблизительно 1 нМ или меньше.

В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело к PD-L1. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-L1 представляет собой высокоаффинное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-L1 представляет собой антитело к PD-L1 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-L1 представляет собой мышинное антитело, химерное антитело или гуманизированное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-L1 представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-L1 связывается с PD-1 человека с K_D 5×10^{-8} М или меньше, связывается с PD-1 человека с K_D 1×10^{-8} М или меньше, связывается с PD-1 человека с K_D 5×10^{-9} М или меньше или связывается с PD-1 человека с K_D между 1×10^{-8} М и 1×10^{-10} М. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-L1 связывается с PD-1 человека с K_D 1×10^{-7} М или меньше.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие рассматриваемый белок.

Нуклеиновые кислоты и векторы.

Предусмотрены нуклеиновые кислоты, которые кодируют рассматриваемый белок (который специфически связывается с PD-L1). Рассматриваемый белок можно кодировать посредством одной или более нуклеиновых кислот. Например, в случаях, когда первый и второй полипептиды антигенсвязывающей части представляют собой отдельные полипептиды (т.е. не слитые друг с другом), первый и второй полипептиды можно кодировать в одной и той же или различных нуклеиновых кислотах. В некоторых вариантах осуществления одну или более нуклеиновых кислот, которые кодируют рассматриваемый связывающий PD-L1 белок (например, антитело, scFv, макситело и т.д.), встраивают в экспрессирующий вектор. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды кодируют в одном и том же векторе. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды кодируют в различных векторах. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид кодируют в первом векторе. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид кодируют во втором векторе. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; фиг. 11A, фиг. 16A). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; фиг. 11B, фиг. 16B). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе гаммаретровируса. В некоторых

вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе pMSCIV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления тяжелую и легкую цепи кодируют в одном и том же векторе. В некоторых вариантах осуществления тяжелую и легкую цепи кодируют в различных векторах. В некоторых вариантах осуществления тяжелую цепь кодируют в первом векторе. В некоторых вариантах осуществления легкую цепь кодируют во втором векторе. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-

H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

Векторы, полученные из ретровирусов, таких как лентивирус, представляют собой подходящие инструменты для того, чтобы добиваться долгосрочного переноса генов, поскольку они делают возможным долгосрочную, стабильную интеграцию трансгена и его передачу в дочерние клетки. Лентивирусные векторы имеют дополнительное преимущество над векторами, полученными из онкоретровирусов, таких как вирусы мышинного лейкоза, в том отношении, что они могут трансдуцировать не пролиферирующие клетки, такие как гепатоциты. Также, в качестве дополнительного преимущества, они обладают низкой иммуногенностью.

Экспрессирующий вектор можно предоставлять клетке (например, вводить в клетку) в форме вирусного вектора. Технология вирусных векторов хорошо известна в данной области и описана, например, в Sambrook et al, (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) и в других руководствах по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, которые можно использовать в качестве векторов, включают, но не ограничиваясь этим, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса и лентивирусы. В целом, подходящий вектор содержит участок начала репликации, функциональный по меньшей мере в одном организме, последовательность промотора, удобные сайты рестрикционных эндонуклеаз и один или более селективных маркеров.

Разработано множество систем на основе вирусов для переноса генов в клетки млекопитающих. Например, ретровирусы предоставляют удобную платформу для систем доставки генов. Выбранный ген можно вставлять в вектор и упаковывать в ретровирусные частицы с применением известных в данной области способов. Затем можно выделять рекомбинантный вирус, и доставлять его в желаемые клетки.

Настоящее раскрытие также предусматривает экспрессирующие векторы, в которые вставляют конструкцию нуклеиновой кислоты по настоящему раскрытию. В некоторых вариантах осуществления можно использовать индуцибельную экспрессирующую систему. Если желательна индуцируемая экспрессия, доступно множество векторов, облегчающих такую индуцируемую экспрессию, включая в качестве неограничивающих примеров, индуцибельные тетрациклином и аналогами тетрациклина векторы, индуцибельные тамоксифеном векторы, а также другие векторы систем индуцибельной транскрипции, известные в данной области.

Конструкцию нуклеиновой кислоты можно функционально связывать с управляющими элементами, которые направляют ее транскрипцию или экспрессию в нуклеотидной последовательности *in vivo*. Такие управляющие элементы могут содержать управляющие последовательности, обычно связанные с выбранным геном (например, эндогенные клеточные управляющие элементы).

Альтернативно можно использовать гетерологичные управляющие последовательности. Эффективные гетерологичные управляющие последовательности в целом включают те, которые получают из последовательностей, кодирующих гены млекопитающих или вирусов. Примеры включают, но не ограничиваясь этим, ранний промотор SV40, промотор длинного концевой повтора (LTR) вируса опухолей молочных желез мышей; главный поздний промотор аденовирусов (Ad MLP); промотор вируса простого герпеса (HSV), эндогенный клеточный промотор, гетерологичный гену, представляющему интерес, промотор цитомегаловируса (CMV), такой как область предраннего промотора CMV (CMVIE), промотор вируса саркомы Рауса (RSV), синтетические промоторы, гибридные промоторы и т.п. Кроме того, также можно использовать последовательности, получаемые из невирусных генов, таких как ген металлотионеина мыши. Такие последовательности промоторов коммерчески доступны, например, в Stratagene (San Diego, Calif.).

В некоторых вариантах осуществления промотор со специфичностью к клеткам или тканям определенного типа можно функционально связывать со вставкой нуклеиновой кислоты, кодирующей гетерологичный продукт гена и допускающей избирательное или предпочтительное продуцирование продукта гена в клетке(х) или ткани(ях) конкретного типа, например, экспрессия в цитотоксических лимфоцитах. В некоторых вариантах осуществления индуцибельный промотор можно функционально связывать с гетерологичной нуклеиновой кислотой.

Векторы, раскрытые в настоящем описании, также могут содержать стандартные управляющие элементы, функционально связанные со вставкой нуклеиновой кислоты (также обозначаемой как гетерологичная нуклеотидная последовательность) таким образом, который допускает транскрипцию, трансляцию и/или экспрессию в клетке, трансфицированной вектором, полученным в соответствии с настоящим изобретением. Как используют в настоящем описании, "функционально связанные" последовательности включают как управляющие экспрессией последовательности, которые смежны с геном, представляющим интерес, так и управляющие экспрессией последовательности, которые действуют в "транс" или на расстоянии для того, чтобы управлять геном, представляющим интерес.

Управляющие экспрессией последовательности включают подходящие последовательности инициации транскрипции, терминации, промоторов и энхансеров; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования (polyA); последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые увеличивают эффективность трансляции (т.е. консенсусная последовательность Козак); последовательности, которые увеличивают стабильность белка; и, когда желательно, последовательности, которые усиливают секрецию кодируемого продукта. В данной области известно и может быть использовано большое число управляющих экспрессией последовательностей, в том числе промоторы, выбранные из нативных, конститутивных, индуцибельных и/или тканеспецифических.

Примеры конститутивных промоторов включают, без ограничения, ретровирусный промотор LTR вируса саркомы Рауса (RSV) (необязательно с RSV энхансером), промотор вируса клеток мышей (MSCV), промотор цитомегаловируса (CMV) (необязательно с CMV энхансером) (см., например, Boshart et al., *Cell*, 41:521-530 (1985)), промотор SV40, промотор дигидрофолатредуктазы, промотор β -актина, промотор фосфолициринкиназы (PGK) и промотор EF1 (Invitrogen). Индуцибельные промоторы делают возможной регуляцию экспрессии гена, и их можно регулировать посредством экзогенно вносимых соединений, средовых факторов, таких как температура, или присутствия конкретного физиологического состояния, например, острой фазы, конкретного состояния дифференцировки клетки или только в реплицирующихся клетках. Индуцибельные промоторы и индуцибельные системы доступны в различных коммерческих источниках, в том числе, без ограничения, Invitrogen, Clontech и Ariad. Многие другие системы описаны и могут быть без труда выбраны специалистом в данной области. Примеры индуцибельных промоторов, регулируемых экзогенно вносимыми соединениями, включают цинк-индуцибельный промотор металлотионеина (MT) овцы, индуцибельный дексаметазоном (Dex) промотор вируса опухолей молочных желез мышей (MMTV), промоторную систему T7 полимеразы (WO 98/10088); экдизоновый промотор насекомых (No et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:3346-3351), репрессируемую тетрациклином систему (Gossen et al., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551), индуцибельную тетрациклином систему (Gossen et al., (1995) *Science*, 268:1766-1769, см. также Harvey et al., (1998) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2:512-518), RU486-индуцибельную систему (Wang et al., (1997) *Nat. Biotech.*, 15:239-243 и Wang et al., (1997) *Gen Ther.*, 4:432-441) и индуцибельную рапамицином систему (Magari et al., (1997) *J. Clin. Invest.*, 100:2865-2872). Индуцибельные промоторы других типов, которые можно использовать в этом контексте, представляют собой те, которые регулируются конкретным физиологическим состоянием, например, температурой, острой фазой, конкретным состоянием дифференцировки клетки или только в реплицирующихся клетках. В некоторых вариантах осуществления лентивирусный вектор, содержащий промотор вируса клеток мышей (MSCV) или промотор фактора элонгации-1 α человека (EF-1 α), используют для того, чтобы экспрессировать нуклеиновую кислоту, кодирующую рассматриваемый связывающий PD-L1 белок, как раскрыто в настоящем описании, например, в связи с любым вариантом осуществления, описанным в настоящем описании.

В другом варианте осуществления используют нативный промотор для вставки нуклеиновой кислоты. Нативный промотор может быть предпочтителен, когда желательно, чтобы экспрессия вставки нуклеиновой кислоты имитировала нативную экспрессию. Нативный промотор можно использовать, когда экспрессию вставки нуклеиновой кислоты следует регулировать во времени или развитии, или тканеспецифическим образом, или в ответ на конкретные транскрипционные стимулы. В дополнительном варианте осуществления другие нативные управляющие экспрессией элементы, такие как энхансерные элементы, сайты полиаденилирования или консенсусные последовательности Козак, также можно использовать для имитации нативной экспрессии.

Другой вариант осуществления нуклеиновой кислоты включает ген, функционально связанный с тканеспецифическим промотором. Например, если желательна экспрессия в Т-клетках и/или цитотоксических лимфоцитах, следует использовать промотор, активный в Т-клетках и/или цитотоксических лимфоцитах.

В различных вариантах осуществления вектор, несущий одну или более вставок нуклеиновой кислоты, также содержит селективные маркеры или репортерные гены, например последовательности, кодирующие устойчивость к генетицину, гиромоцину или пурамицину, среди прочего. Отбираемые репортеры или маркерные гены можно использовать для того, чтобы сигнализировать о присутствии плазмид/векторов в бактериальных клетках, в том числе, например, при испытании устойчивости к ампициллину. Другие компоненты плазмиды могут включать участок начала репликации. Выбор этих других промоторов и векторных элементов является стандартным, и многие такие последовательности доступны (см., например, Sambrook et al., и цитируемые в них ссылки).

В некоторых случаях, рассматриваемая нуклеиновая кислота содержит промотор, который функционально связан с нуклеотидной последовательностью, кодирующей рассматриваемый связывающий PD-L1 белок. Подходящие промоторы включают конститутивные промоторы (например, промотор CMV, промотор EF1 α , MSCV и т.п.), а также индуцибельные промоторы (например, индуцибельные тетрациклином и аналогами тетрациклина промоторы, индуцибельные тамоксифеном промоторы и т.п.) и условные промоторы, такие как промотор NR4A1. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит транспозоны.

В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой pLEV, имеющий нуклеотидную последовательность, как предоставлено на фиг. 10. В некоторых вариантах осуществления вектор pLEV, содержащий связывающий PD-L1 белок, предоставлен на фиг. 11. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой SEQ ID NO: 41 (фиг. 11A). В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой SEQ ID NO: 42 (фиг. 11B). В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор, представленный на фиг. 16A. В некоторых вариантах осуществления вектор представлен на фиг. 16B.

В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой ретровирусный вектор, такой как гаммаретровирусный вектор.

В некоторых случаях, рассматриваемую нуклеиновую кислоту, кодирующую связывающий PD-L1 белок, включают в плазмиду, например, для временной экспрессии в эукариотической клетке, для геномной интеграции экспрессирующей кассеты (которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую связывающий PD-L1 белок, функционально связанный с промотором) в эукариотической клетке, для размножения в бактериальной клетке и т.п.

Клетки

Настоящее раскрытие предусматривает клетки, которые содержат рассматриваемый белок, который специфически связывается с PD-L1, и/или содержат нуклеиновую кислоту (например, как рассмотрено выше), кодирующую белок. Для клеток, которые содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую рассматриваемый белок, который специфически связывается с PD-L1, нуклеиновую кислоту можно поддерживать эписомально (например, может представлять собой плазмиду) или нуклеиновую кислоту можно встраивать в геном. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды кодируют в одной и той же нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды кодируют в различных нуклеиновых кислотах. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид кодируют в нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид кодируют в нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой вектор на лентивирусной основе. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; фиг. 11A, фиг. 16A). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; фиг. 11B, фиг. 16B). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEVT. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе гаммаретровируса. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе pMSCIV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осу-

шествления вирусный вектор кодирует 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления тяжелую и легкую цепи кодируют в одном и том же векторе. В некоторых вариантах осуществления тяжелую и легкую цепи кодируют в различных векторах. В некоторых вариантах осуществления тяжелую цепь кодируют в первом векторе. В некоторых вариантах осуществления легкую цепь кодируют во втором векторе. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В

некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

Клетки могут представлять собой клетки любого удобного типа. Например, в некоторых случаях, рассматриваемая клетка представляет собой прокариотическую клетку. Например, может представлять собой клетку *E. coli*, используемую для размножения нуклеиновой кислоты (например, плазмиды), которая кодирует рассматриваемый белок. В некоторых случаях, клетка представляет собой эукариотическую клетку (например, клетку млекопитающего, клетку крысы, клетку мыши, клетку человека). В некоторых случаях, клетка представляет собой цитотоксический лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой цитотоксический лимфоцит, и ее можно обозначать как цитотоксический лимфоцит, который генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать растворимый связывающий лиганд запрограммированной смерти 1 (PD-L1) белок. В таких случаях, термин "генетически модифицирован" охватывает сценарии, в которых нуклеиновую кислоту поддерживают эписомально, а также сценарии, в которых нуклеиновую кислоту встраивают в геном клетки. В некоторых случаях, клетка представляет собой цитотоксический лимфоцит, который генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать растворимый связывающий лиганд запрограммированной смерти 1 (PD-L1) белок, где генетическая модификация представляет собой модификацию генома (т.е., нуклеиновую кислоту, кодирующую рассматриваемый белок, встраивают в геном клетки).

Цитотоксические лимфоциты, которые можно генетически модифицировать для того, чтобы экспрессировать и секретировать рассматриваемый связывающий PD-L1 белок, как раскрыто в настоящем описании, например, в связи с любым вариантом осуществления, описанным в настоящем описании, включают цитотоксические Т-клетки (CTL), естественные киллерные Т-клетки (NKT) и естественные киллерные (NK) клетки. Цитотоксические лимфоциты могут включать, например, полученные из периферической крови $\alpha\beta$ TCR-положительные или $\gamma\delta$ TCR-положительные Т-клетки, активированные опухолеспецифическими антигенами и/или трансдуцированные опухолеспецифическими химерными антигенными рецепторами или Т-клеточными рецепторами, и инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL). В некоторых вариантах осуществления цитотоксический лимфоцит модифицирован для того, чтобы экспрессировать и секретировать рассматриваемый связывающий PD-L1 белок, выбранный из группы, состоящей из 38A1 и 19H9. В некоторых вариантах осуществления цитотоксический лимфоцит модифицирован для того, чтобы экспрессировать и секретировать 38A1. В некоторых вариантах осуществления цитотоксический лимфоцит модифицирован для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19H9.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксическая Т-клетка в соответствии с настоящим раскрытием представляет собой CD8⁺ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления цитотоксическая Т-клетка в соответствии с настоящим раскрытием представляет собой CD4⁺ Т-хелперную клетку. В некоторых вариантах осуществления цитотоксическая Т-клетка в соответствии с настоящим раскрытием представляет собой CD8⁺ Т-клетку, модифицированную для того, чтобы экспрессировать и секретиро-

вать рассматриваемый связывающий PD-L1 белок, как раскрыто в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления цитотоксическая Т-клетка в соответствии с настоящим раскрытием представляет собой CD4+ Т-хелперную клетку, модифицированную для того, чтобы экспрессировать и секретировать рассматриваемый связывающий PD-L1 белок, как раскрыто в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления цитотоксическая Т-клетка в соответствии с настоящим раскрытием представляет собой CD8+ Т-клетку, модифицированную для того, чтобы экспрессировать и секретировать 38A1. В некоторых вариантах осуществления цитотоксическая Т-клетка в соответствии с настоящим раскрытием представляет собой CD4+ Т-хелперную клетку, модифицированную для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19H9. В некоторых вариантах осуществления цитотоксическая Т-клетка в соответствии с настоящим раскрытием представляет собой CD8+ Т-клетку, модифицированную для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления цитотоксическая Т-клетка в соответствии с настоящим раскрытием представляет собой CD4+ Т-хелперную клетку, модифицированную для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 38A1 или 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID

NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

Цитотоксический лимфоцит, который можно генетически модифицировать для того, чтобы экспрессировать и секретировать рассматриваемый связывающий PD-L1 белок, как раскрыто в настоящем описании, например, в связи с любым вариантом осуществления, описанным в настоящем описании, может экспрессировать один или более антигенов активации. Например, цитотоксический лимфоцит в ответствии с настоящим раскрытием может демонстрировать повышенный уровень экспрессии одного или более антигенов активации относительно наивной Т-клетки. Один или более антигенов активации можно выбирать, например, из CD25, CD26, CD27, CD28, CD38, CD40L, CD69, CD134, CD137, BTLA, PD-1, HVEM, LIGHT и HLA-DR. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 38A1 или 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антиген-связывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или подпадающего обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с ис-

пользованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно

содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксический лимфоцит, который можно генетически модифицировать для того, чтобы экспрессировать и секретировать рассматриваемый связывающий PD-L1 белок, как раскрыто в настоящем описании, например, в связи с любым вариантом осуществления, описанным в настоящем описании, содержит, или его генетически модифицируют, чтобы он содержал, рецептор со специфичностью к опухолеассоциированному антигену, например, опухолеассоциированному антигену из опухоли субъекта, подлежащего лечению с использованием генетически модифицированного цитотоксического лимфоцита в соответствии с настоящим раскрытием. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 38A1 или 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная лег-

кая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

Цитотоксический лимфоцит, который можно генетически модифицировать для того, чтобы экспрессировать и секретировать рассматриваемый связывающий PD-L1 белок, как раскрыто в настоящем описании, например, в связи с любым вариантом осуществления, описанным в настоящем описании, можно получать из любой подходящей ткани или текущего вещества субъекта. Например, в некоторых вариантах осуществления цитотоксический лимфоцит можно получать из периферической крови субъекта. В некоторых вариантах осуществления цитотоксический лимфоцит, который можно генетически модифицировать для того, чтобы экспрессировать и секретировать рассматриваемый связывающий PD-L1 белок, как раскрыто в настоящем описании, например, в связи с любым вариантом осуществления, описанным в настоящем описании, представляет собой TIL, полученный из опухоли субъекта. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 38A1 или 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченно-

го с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгиро-

ванный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

Поддающиеся обнаружению метки

В некоторых вариантах осуществления рассматриваемый белок, который специфически связывается с PD-L1 (т.е. рассматриваемый связывающий PD-L1 белок), как раскрыто в настоящем описании, например, в связи с любым вариантом осуществления, описанным в настоящем описании, содержит одну или более поддающихся обнаружению меток. Различные подходящие поддающиеся обнаружению метки известны в данной области, включая в качестве неограничивающих примеров, радиоактивные изотопы, флуорофоры, хемилуминофоры, хромофоры, ферменты, ферментативные субстраты, кофакторы ферментов, ингибиторы ферментов, хромофоры, красители, ионы металлов, золи металлов, лиганды (например, биотин, авидин, стрептавидин или гаптены) и т.п. Термин "флуорофор" относится к веществу или его части, которые способны проявлять флуоресценцию в поддающемся обнаружению диапазоне. Примеры поддающихся обнаружению меток, пригодных для использования в качестве компонентов рассматриваемых связывающих PD-L1 белков, включают аффинные метки и флуоресцентные белки (например, GFP, YFP, RFP, CFP и т.п.). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 38A1 или 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антиген-связывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID

NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

Термин "аффинная метка" используют в настоящем описании для обозначения пептидного сегмента, например, гетерологичного пептидного сегмента, который можно встраивать в рассматриваемый связывающий PD-L1 белок и обнаруживать с использованием молекулы, которая связывает аффинную метку и предоставляет поддающейся обнаружению сигнал (например, флуоресцентное соединение или белок). В принципе, любой пептид или белок, для которого доступно антитело или другое специфическое связывающее средство, можно использовать в качестве аффинной метки. Примеры аффинных меток, пригодных для использования, включают, но не ограничиваясь этим, пептид, связывающий моноцитарный адаптерный белок (MONA), T7-связывающий пептид, стрептавидинсвязывающий пептид, полигистидиновый тракт, белок A (Nilsson et al., EMBO J. 4:1075 (1985); Nilsson et al., Methods Enzymol. 198:3 (1991)), глутатион-S-трансферазу (Smith and Johnson, Gene 67:31 (1988)), аффинную метку Glu-Glu (Grusenmeyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7952 (1985)), вещество P, пептид FLAG (Hopp et al., Biotechnology 6:1204 (1988)) или другой антигенный эпитоп или связывающий домен. См., в целом, Ford et al., Protein Expression and Purification 2:95 (1991). Молекулы ДНК, кодирующие аффинные метки, доступны у коммерческих поставщиков (например, Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 38A1 или 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую

вающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую

90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

Любой флуоресцентный полипептид (также обозначаемый в настоящем описании как флуоресцентная метка), хорошо известный в данной области, пригоден для использования в качестве подающей обнаружению метки непосредственно или в связи с аффинной меткой. Подходящий флуоресцентный полипептид представляет собой тот, который можно экспрессировать в желаемой клетке-хозяине, такой как бактериальная клетка или клетка млекопитающего, и который без труда предоставляет подающийся обнаружению сигнал, который можно оценивать качественно (положительный/отрицательный) и количественно (например, сравнительная степень флуоресценции). Примеры флуоресцентных полипептидов включают, но не ограничиваясь этим, желтый флуоресцентный белок (YFP), голубой флуоресцентный белок (CFP), GFP, mRFP, RFP (tdimer2), HCRED и т.д. или любой их мутант (например, флуоресцентные белки, модифицированные для обеспечения усиленной флуоресценции или смещенного спектра испускания), аналог или производное. Дополнительные подходящие флуоресцентные полипептиды, а также конкретные примеры тех, что перечислены в настоящем описании, предоставлены в данной области и хорошо известны. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 38A1 или 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или подающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или подающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1,

и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

Метки на основе биотина также могут найти применение в рассматриваемых связывающих PD-L1 белках, раскрытых в настоящем описании. Хорошо известно о биотинилировании молекул и субстратов, например, известно большое число средств биотинилирования, в том числе средства, способные реагировать с аминами и тиолами, для биотинилирования белков, нуклеиновых кислот, углеводов, карбоновых кислот; см., например, главу 4, Molecular Probes Catalog, Haugland, 6-е изд. 1996, включено, таким образом, посредством ссылки. Биотинилированный субстрат можно обнаруживать посредством связывания партнера связывания биотина, меченного с возможностью обнаружения, такого как авидин или стрептавидин. Аналогичным образом, также известно большое число реактивов для гаптенилирования. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 38A1 или 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в

клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), со-

держаний SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

Способы

Адоптивный перенос клеток

Адоптивный перенос клеток (АСТ) представляет собой очень эффективную форму иммунотерапии, и включает перенос клеток иммунной системы с противоопухолевой активностью пациентам со злокачественными опухолями. АСТ представляет собой подход к лечению, который включает идентификацию, *in vitro*, лимфоцитов с противоопухолевой активностью, размножение этих клеток *in vitro* до большого числа и их инфузию хозяину, несущему злокачественную опухоль. Лимфоциты, используемые для адоптивного переноса, можно получать из стромы иссеченных опухолей (инфильтрирующие опухоль лимфоциты или ТИЛ). Также их можно получать или из крови, если их генетически конструируют для того, чтобы экспрессировать противоопухолевые Т-клеточные рецепторы (TCR) или химерные антигенные рецепторы (CAR), обогащают смешанными культурами лимфоцитов и опухолевых клеток (MLTC) или клонируют с использованием аутологичных антигенпредставляющих клеток и пептидов, полученных из опухоли. АСТ, в котором лимфоциты, подлежащие инфузии, происходят от хозяина, несущего злокачественную опухоль, называют аутологичным АСТ. Публикация США № 2011/0052530 относится к способу осуществления адоптивной клеточной терапии для того, чтобы содействовать регрессии злокачественной опухоли, в первую очередь, для лечения пациентов, страдающих метастатической меланомой, и она включена посредством ссылки в полном объеме ради этих способов.

В некоторых вариантах осуществления ТИЛ и/или цитотоксические лимфоциты можно вводить в однократной дозе. Такое введение может быть опосредовано инъекцией, например, внутривенной инъекцией. В некоторых вариантах осуществления ТИЛ и/или цитотоксические лимфоциты можно вводить в нескольких дозах. Дозирование может происходить один раз, два раза, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз или больше чем шесть раз в год. Дозирование может происходить раз в месяц, раз в две недели, раз в неделю или через сутки. Введение ТИЛ и/или цитотоксических лимфоцитов можно продолжать до тех пор, пока необходимо.

В некоторых вариантах осуществления эффективная доза ТИЛ и/или цитотоксических лимфоцитов составляет приблизительно 1×10^6 , приблизительно 2×10^6 , приблизительно 3×10^6 , приблизительно 4×10^6 , приблизительно 5×10^6 , приблизительно 6×10^6 , приблизительно 7×10^6 , приблизительно 8×10^6 , приблизительно 9×10^6 , приблизительно 1×10^7 , приблизительно 2×10^7 , приблизительно 3×10^7 , приблизительно 4×10^7 , приблизительно 5×10^7 , приблизительно 6×10^7 , приблизительно 7×10^7 , приблизительно 8×10^7 , приблизительно 9×10^7 , приблизительно 1×10^8 , приблизительно 2×10^8 , приблизительно 3×10^8 , приблизительно 4×10^8 , приблизительно 5×10^8 , приблизительно 6×10^8 , приблизительно 7×10^8 , приблизительно 8×10^8 , приблизительно 9×10^8 , приблизительно 1×10^9 , приблизительно 2×10^9 , приблизительно 3×10^9 , приблизительно 4×10^9 , приблизительно 5×10^9 , приблизительно 6×10^9 , приблизительно 7×10^9 , приблизительно 8×10^9 , приблизительно 9×10^9 , приблизительно 1×10^{10} , приблизительно 2×10^{10} , приблизительно 3×10^{10} , приблизительно 4×10^{10} , приблизительно 5×10^{10} , приблизительно 6×10^{10} , приблизительно 7×10^{10} , приблизительно 8×10^{10} , приблизительно 9×10^{10} , приблизительно 1×10^{11} , приблизительно 2×10^{11} , приблизительно 3×10^{11} , приблизительно 4×10^{11} , приблизительно 5×10^{11} , приблизительно 6×10^{11} , приблизительно 7×10^{11} , приблизительно 8×10^{11} , приблизительно 9×10^{11} , приблизительно 1×10^{12} , приблизительно 2×10^{12} , приблизительно 3×10^{12} , приблизительно 4×10^{12} , приблизительно 5×10^{12} , приблизительно 6×10^{12} , приблизительно 7×10^{12} , приблизительно 8×10^{12} , приблизительно 9×10^{12} , приблизительно 1×10^{13} , приблизительно 2×10^{13} , приблизительно 3×10^{13} , приблизительно 4×10^{13} , приблизительно 5×10^{13} , приблизительно 6×10^{13} , приблизительно 7×10^{13} , приблизительно 8×10^{13} и приблизительно 9×10^{13} . В некоторых вариантах осуществления эффективная доза ТИЛ и/или цитотоксических лимфоцитов находится в диапазоне приблизительно от

1×10^6 приблизительно до 5×10^6 , приблизительно от 5×10^6 приблизительно до 1×10^7 , приблизительно от 1×10^7 приблизительно до 5×10^7 , приблизительно от 5×10^7 приблизительно до 1×10^8 , приблизительно от 1×10^8 приблизительно до 5×10^8 , приблизительно от 5×10^8 приблизительно до 1×10^9 , приблизительно от 1×10^9 приблизительно до 5×10^9 , приблизительно от 5×10^9 приблизительно до 1×10^{10} , приблизительно от 1×10^{10} приблизительно до 5×10^{10} , приблизительно от 5×10^{10} приблизительно до 1×10^{11} , приблизительно от 5×10^{11} приблизительно до 1×10^{12} , приблизительно от 1×10^{12} приблизительно до 5×10^{12} и приблизительно от 5×10^{12} приблизительно до 1×10^{13} . В некоторых вариантах осуществления ТП и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19Н9 или 38А1. В некоторых вариантах осуществления, ТП и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19Н9. В некоторых вариантах осуществления ТП и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 38А1. В некоторых вариантах осуществления, ТП и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19Н9 из рLV4301G PDLV scFV 19Н9 (SEQ ID NO: 38; фиг. 11В, фиг. 16В). В некоторых вариантах осуществления ТП и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 38А1 из рLV4301G PDLV scFV 38А1 (SEQ ID NO: 37; фиг. 11А, фиг. 16А). В некоторых вариантах осуществления, ТП и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления, ТП и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют лентивирусным вектором для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38А1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19Н9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19Н9. В некоторых вариантах осуществления белок 38А1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19Н9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19Н9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19Н9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19Н9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19Н9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19Н9. В некоторых вариантах осуществления белок 38А1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19Н9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38А1. В некоторых вариантах осуществления белок 19Н9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38А1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления тяжелую и легкую цепи кодируют в одном и том же векторе или нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах осуществления тяжелую и легкую цепи кодируют в различных векторах или нуклеиновых кислотах. В некоторых вариантах осуществления тяжелую цепь кодируют в первом векторе или нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах осуществления легкую цепь кодируют во втором векторе или нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-

L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

Контакт клеток с рассматриваемым белком

Предусмотрены способы уменьшения взаимодействия между PD-L1 на первой клетке (например, клетке злокачественной опухоли, такой как опухолевая клетка) и PD-1 на другой клетке (например, клетке иммунной системы, такой как Т-клетка). Такие способы могут включать контакт PD-L1 на первой клетке с рассматриваемым связывающим PD-L1 белком (например, антителом против PD-L1, scFv против PD-L1, максителом против PD-L1 и т.д.). Любое количество уменьшения может быть полезно в некоторых случаях (в зависимости от контекста). В некоторых случаях, взаимодействие между PD-L1 и PD-1 уменьшают на 10% или больше (например, 20% или больше, 30% или больше, 50% или больше, 60% или больше, 75% или больше, 80% или больше, 85% или больше, 90% или больше, 95% или больше или 100%). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 38A1 или 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или

увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv),

содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

Любой удобный анализ можно использовать для того, чтобы измерять количество уменьшения, и такие анализы известны специалисту в данной области. Примеры анализов для измерения количества уменьшения (например, где анализы можно осуществлять в присутствии в сравнении с отсутствием рассматриваемого связывающего PD-L1 белка, такого как антитело против PD-L1, scFv против PD-L1, макситело против PD-L1 и т.п.) могут включать, но не ограничиваясь этим: измерение ингибирования продуцирования цитокинов в анализах реакции смешанной культуры лимфоцитов (анализы MLR, например, аллоанализы MLR), измерение взаимодействий между инфильтрирующими опухоль лимфоцитами (TIL) и гомологичной опухолью, измерение цитотоксичности (например, анализы цитотоксичности, такие как анализы для того, чтобы измерять цитотоксическую активность Т-клеток, направленную на экспрессирующую PD-L1 клетку, такую как клетка злокачественной опухоли), измерение транслокации NFκB в ядро и измерение активности передачи/выведения сигнала из пути передачи сигнала PI3K/AKT/mTOR (например, см. Wang et al., *Cancer Immunol Res.* 2014 Sep; 2(9):846-56).

Контакт может происходить *in vitro* (например, клетки в культуре). В некоторых случаях контакт происходит *in vivo*. Например, в некоторых случаях контакт включает введение рассматриваемого связывающего PD-L1 белка индивидууму. В таких случаях способ можно считать способом лечения (для индивидуума, который имеет злокачественную опухоль, для индивидуума, который имеет солидную опухоль, для индивидуума, который имеет хроническую инфекцию (например, хроническую вирусную инфекцию и т.п.). В некоторых случаях, контакт включает введение в клетку (например, клетку, экспрессирующую PD-L1, клетку, экспрессирующую PD-1, или третью клетку) нуклеиновой кислоты, кодирующей рассматриваемый связывающий PD-L1 белок, и клетка, в которую вводят нуклеиновую кислоту, продуцирует и секретирует связывающий PD-L1 белок. В случаях, когда нуклеиновую кислоту вводят в третью клетку, третью клетку затем можно использовать для предоставления связывающего PD-L1 белка через секрецию. В некоторых вариантах осуществления, где нуклеиновую кислоту вводят в третью клетку, третью клетку затем можно использовать для предоставления индивидууму или субъекту, нуждающемуся в этом связывающем PD-L1 белке, через секрецию. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 38A1 или 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего

Терапевтические составы, содержащие один или более связывающих PD-L1 белков по раскрытию, можно получать для хранения посредством смешивания связывающего PD-L1 белка, имеющего желаемую степень чистоты, с необязательными физиологически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences 16-е изд., Osol, A. ред. (1980)), в форме лиофилизированных составов или водных растворов. Композицию связывающего PD-L1 белка можно формулировать, дозировать и вводить таким образом, который находится в соответствии с надлежащей медицинской практикой. Факторы, учитываемые в этом контексте, включают конкретное нарушение, подлежащее лечению, конкретное млекопитающее, подлежащее лечению, клиническое состояние индивидуального пациента, причину нарушения, место доставки средства, способ введения, схему введения и другие факторы, известные практикующим медикам. "Терапевтически эффективное количество" связывающего PD-L1 белка, подлежащего введению, можно выбирать, руководствуясь такими соображениями, и оно является минимальным количеством, необходимым для того, чтобы лечить заболевание пациента (например, злокачественную опухоль, хроническую инфекцию). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 38A1 или 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO:

Специалист в данной области поймет, что такие руководства следует корректировать по молекулярной массе активного средства, например, при использовании фрагментов антител или при использовании конъюгатов антител. Дозу также можно варьировать для локализованного введения, например, интраназального, ингаляционного и т.д., или для системного введения, например, i.m., i.p., i.v. и т.п. В некоторых вариантах осуществления вводимое антитело представляет собой 19H9 или 38A1 или их сочетание. В некоторых вариантах осуществления вводимое антитело представляет собой 19H9. В некоторых вариантах осуществления вводят связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления вводимое антитело представляет собой 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

Связывающий PD-L1 белок без необходимости, но необязательно формулируют с одним или более средствами, которые потенцируют активность или которые иным образом увеличивают терапевтический

эффект. В целом их используют в тех же дозах и с использованием путей введения, как использовали в настоящем описании ранее или приблизительно от 1 до 99% от использованных до настоящего времени доз. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 38A1 или 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осу-

шествования связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы нетоксичны для реципиентов в используемых дозах и концентрациях и включают буферы, такие как фосфатный, цитратный и других органических кислот; антиоксиданты, в том числе аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (меньше 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие средства, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексные соединения с металлами (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные средства, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (PEG). Составы, подлежащие использованию для введения *in vivo*, могут быть стерильными. Этого легко добиваться посредством фильтрации через мембраны для стерилизующего фильтрации.

Связывающий PD-L1 белок (например, антитело против PD-L1, макситело против PD-L1, scFV против PD-L1 и т.п.) можно вводить с помощью любых подходящих средств, в том числе парентерально, подкожно, интраперитонеально, внутривенно и интраназально. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, интраперитонеальное или подкожное введение. Кроме того, связывающий PD-L1 белок (например, антитело против PD-L1, макситело против PD-L1, scFV против PD-L1 и т.п.) подходящим образом вводят посредством импульсной инфузии, в частности с убывающими дозами связывающего белка. В некоторых случаях рассматриваемый связывающий PD-L1 белок вводят системно (например, *i.v.*). В некоторых случаях рассматриваемый связывающий PD-L1 белок вводят локально (например, внутрь опухоли, например, через инъекцию). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 38A1 или 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii)

сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую

цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

Для предотвращения или лечения заболевания подходящая доза связывающего PD-L1 белка может зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, как определено выше, тяжести и течения заболевания, вводят ли связывающий PD-L1 белок для профилактических целей, предыдущей терапии, клинического анамнеза пациента и ответа на связывающий PD-L1 белок, а также усмотрения лечащего врача. Связывающий PD-L1 белок можно вводить пациенту за один раз или в течение серии лечений. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 38A1 или 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последова-

тельность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

Способы адоптивного переноса клеток с использованием цитотоксических лимфоцитов, генетически модифицированных для того, чтобы экспрессировать и секретировать растворимый связывающий лиганд запрограммированной смерти 1 (PD-L1) белок.

Цитотоксические лимфоциты, которые экспрессируют и секретируют рассматриваемый связывающий PD-L1 белок, как раскрыто в настоящем описании, например в связи с любым вариантом осуществления, описанным в настоящем описании, находят использование в способах адоптивного переноса клеток, например, в контексте лечения злокачественной опухоли или хронической инфекции.

В некоторых вариантах осуществления подходящие способы в соответствии с настоящим раскрытием включают, например, выделение цитотоксических лимфоцитов, как раскрыто в настоящем описании, например, в связи с любым вариантом осуществления, описанным в настоящем описании, у субъекта, например, из опухоли или периферической крови субъекта.

В некоторых вариантах осуществления подходящие способы в соответствии с настоящим раскрытием включают, например, генетическую модификацию цитотоксических лимфоцитов посредством введения в цитотоксические лимфоциты нуклеиновой кислоты, кодирующей рассматриваемый связывающий PD-L1 белок, как раскрыто в настоящем описании, например, в связи с любым вариантом осуществления, описанным в настоящем описании, где генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты экспрессируют и секретируют рассматриваемый связывающий PD-L1 белок, как раскрыто в настоящем описании, например, в связи с любым вариантом осуществления, описанным в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 38A1 или 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую

способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок

представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

В некоторых вариантах осуществления подходящие способы в соответствии с настоящим раскрытием включают, например, размножение генетически модифицированного цитотоксического лимфоцита для того, чтобы предоставлять популяцию генетически модифицированных цитотоксических лимфоцитов. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19H9 или 38A1. В некоторых вариантах осуществления, TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19H9. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 38A1. В некоторых вариантах осуществления, TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19H9 из pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; фиг. 11B, 16B). В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 38A1 из pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; фиг. 11A, фиг. 16A). В некоторых вариантах осуществления, TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления, TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют лентивирусным вектором для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или

увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления тяжелую и легкую цепи кодируют в одном и том же векторе или нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах осуществления тяжелую и легкую цепи кодируют в различных векторах или нуклеиновых кислотах. В некоторых вариантах осуществления тяжелую цепь кодируют в первом векторе или нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах осуществления легкую цепь кодируют во втором векторе или нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

В некоторых вариантах осуществления подходящие способы в соответствии с настоящим раскрытием включают, например, введение популяции генетически модифицированных цитотоксических лимфоцитов субъекту для того, чтобы лечить заболевание или нарушение у субъекта, например злокачест-

венную опухоль или хроническую инфекцию. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19H9 или 38A1. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19H9. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 38A1. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19H9 из pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; фиг. 11B, фиг. 16B). В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 38A1 из pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; фиг. 11A, 16A). В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют лентивирусным вектором для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления тяжелую и легкую цепи кодируют в одном и том же векторе или нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах осуществления тяжелую и легкую цепи кодируют в различных векторах или нуклеиновых кислотах. В некоторых вариантах осуществления тяжелую цепь кодируют в первом векторе или нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах осуществления легкую цепь кодируют во втором векторе или нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентично-

стью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

Выделение цитотоксических лимфоцитов у субъекта

В данной области известны многие подходящие способы выделения цитотоксических лимфоцитов у субъекта, например человеческого субъекта, и можно использовать любой удобный способ. Например, инфильтрирующие опухоль лимфоциты, как раскрыто в настоящем описании, например, в связи с любым вариантом осуществления, описанным в настоящем описании, можно выделять из свежих биоптатов пациента. Альтернативно, цитотоксические лимфоциты можно получать из периферической крови субъекта. Хотя способы, описанные в настоящем описании, описаны в первую очередь в контексте аутологичных цитотоксических лимфоцитов, используемых для АСТ. Следует отметить, что в некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты можно получать или создавать из источника, отличного от субъекта, подлежащего лечению, как рассмотрено более подробно ниже.

Генетическая модификация цитотоксических лимфоцитов

Генетическая модификация цитотоксических лимфоцитов для того, чтобы экспрессировать и секретировать рассматриваемый связывающий PD-L1 белок, как раскрыто в настоящем описании, например, в связи с любым вариантом осуществления, описанным в настоящем описании, может включать введение в цитотоксические лимфоциты нуклеиновой кислоты, кодирующей рассматриваемый связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит первый и второй полипептид. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды кодируют в одном и том же векторе. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды кодируют в различных векторах. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид кодируют в первом векторе. В данной области известно много путей для достижения этого, и можно использовать любой удобный способ (например, с использованием любого удобного вектора или комбинации векторов, например, ретровирусного вектора, например, лентивирусного вектора, аденовирусного вектора или других векторов, например, вместе с подходящими упаковывающими и оболочечными плазмидами). Регуляторные элементы для лентивирусных векторов, например промоторы, можно выбирать, в частности для стабильной

экспрессии в цитотоксических лимфоцитах. См., например, Jones et al. Hum Gene Ther. 2009 Jun; 20(6): 630-640, где описано использование лентивирусного вектора, содержащего промотор вируса клеток мышей (MSCV), для использования как с минимально стимулированными, так и сильно активированными лимфоцитами. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок, кодируемый вектором, представляет собой 38A1 или 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок, кодируемый вектором, представляет собой 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок, кодируемый вектором, представляет собой 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок, кодируемый вектором, содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок, кодируемый одним или более векторами, представляет собой антитело или его фрагмент, которые содержат тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок, кодируемый одним или более векторами, представляет собой антитело или его фрагмент, которые содержат тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок, кодируемый одним или более векторами, представляет собой антитело или его фрагмент, которые содержат легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок, кодируемый одним или более векторами, представляет собой антитело или его фрагмент, которые содержат тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок, кодируемый одним или более векторами, представляет собой антитело или его фрагмент, которые содержат тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок, кодируемый одним или более векторами, представляет собой антитело или его фрагмент, которые содержат легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществ-

вления конъюгация происходит через линкер.

В некоторых вариантах осуществления ген рассматриваемого связывающего PD-L1 белка может быть частью более крупной кассеты экспрессии гена, введенной в цитотоксические лимфоциты, которая делает возможной индуцируемую экспрессию рассматриваемого связывающего PD-L1 белка, например, с использованием лекарственного средства, проникающего через клеточную мембрану, которое активирует промоторные элементы, управляющие геном рассматриваемого PD-L1. Изъятие лекарственного средства будет выключать экспрессию гена, что делает возможной регулируемое включение/выключение экспрессии рассматриваемого связывающего PD-L1 белка. Доступно множество векторов, облегчающих эту индуцируемую экспрессию, включая в качестве неограничивающих примеров, индуцибельные тетрациклином и аналогами тетрациклина векторы, индуцибельные тамоксифеном векторы, а также другие векторы систем индуцибельной транскрипции, известные в данной области. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 38A1 или 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая

цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

Схематический пример экспрессирующего вектора (например, лентивектора), кодирующего индуцибельный промотор, предоставлен на фиг. 8. Базовая конструкция содержит два промотора. Один промотор конститутивно активен и управляет транскрипцией конформационного фактора транскрипции (CTF), который меняет конформацию при связывании с растворимой молекулой (SM). Вторым промотор связывает CTF и управляет геном, представляющим интерес. Имеют место две возможности. В обоих случаях связывание CTF с его промотором опосредует транскрипцию. В первом случае, добавление SM высвобождает CTF из индуцибельного промотора, останавливая транскрипцию. Во втором случае, добавление SM индуцирует связывание CTF с индуцибельным промотором и инициацию транскрипции.

Схема другого примера экспрессирующего вектора (например, лентивектора) предоставлена на фиг. 9, где схематически изображен ингибируемый экспрессирующий вектор, кодирующий конформационный репрессорный белок. Базовая конструкция содержит два промотора. Оба промотора конститутивно активны. Один управляет транскрипцией конформационного репрессорного белка (CRP), который меняет конформацию при связывании с растворимой молекулой (SM). CRP связывается с сайтом связывания CRP (CRP-BS) и ингибирует транскрипцию второго конститутивного промотора, управляющего транскрипцией гена, представляющего интерес. Добавление растворимой молекулы высвобождает CRP из CRP-BS, "высвобождая" транскрипцию гена, представляющего интерес.

На фиг. 16 приведены дополнительные схемы образцовых вирусных векторов для использования с данными способами, в том числе pLV4301G PDLV scFV 38A1 и pLV4301G PDLV scFV 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; фиг. 11A, 16A). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; фиг. 11B, 16B).

Растворимая молекула, используемая как описано выше с индуцибельными экспрессирующими векторами, может представлять собой любую подходящую молекулу, известную в данной области для использования с такими индуцибельными экспрессирующими векторами, например, тетрациклин (или его аналоги) или тамоксифен. Такие растворимые молекулы можно вводить субъекту в соответствии с одним или более способами, описанными в настоящем описании, например, до, одновременно с или после введения генетически модифицированных цитотоксических лимфоцитов, как раскрыто в настоящем описании, например, в связи с любым вариантом осуществления, описанным в настоящем описании,

субъекту. Альтернативно, или кроме того, можно использовать экспрессирующие векторы, которые содержат элементы, реагирующие на условия и/или молекулы, присутствующие в желаемом месте приложения действия в субъекте, например, микроокружении опухоли. Например, экспрессирующие векторы, содержащие реагирующий на гипоксию элемент, можно использовать для того, чтобы избирательно индуцировать экспрессию в гипоксическом микроокружении солидной опухоли. См., например, Wang et al. *Cancer Gene Ther.* 2005 Mar; 12(3):276-83.

Дополнительные способы трансфекции, которые могут включать вирусные и невирусные способы, можно использовать в зависимости от ситуации, чтобы вводить нуклеиновые кислоты, кодирующие рассматриваемые связывающие PD-L1 белки, в цитотоксические лимфоциты. Способы, которые можно использовать для того, чтобы содействовать доставке в цитотоксические лимфоциты, могут включать, например, электропорацию, бомбардировку частицами (генная пушка), сонопорацию, магнитофекцию, гидродинамическую доставку, доставку наночастиц, липофекцию и т.д. В некоторых вариантах осуществления кодируемый связывающий PD-L1 белок представляет собой 38A1 или 19H9. В некоторых вариантах осуществления кодируемый связывающий PD-L1 белок представляет собой 38A1. В некоторых вариантах осуществления кодируемый связывающий PD-L1 белок представляет собой 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок, кодируемый одним или более векторами, представляет собой антитело или его фрагмент, где легкую цепь кодируют с помощью первого вектора и тяжелую цепь кодируют с помощью второго вектора. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок, кодируемый одним или более векторами, представляет собой антитело или его фрагмент, которые содержат тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок, кодируемый одним или более векторами, представляет собой антитело или его фрагмент, которые содержат тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок, кодируемый одним или более векторами, представляет собой антитело или его фрагмент, которые содержат тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая

ствления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 19Н9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе рLEV, кодирующий 19Н9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 38А1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 38А1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе рLEV, кодирующий 38А1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38А1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19Н9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19Н9. В некоторых вариантах осуществления белок 38А1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19Н9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или подающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19Н9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19Н9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или подающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19Н9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19Н9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19Н9. В некоторых вариантах осуществления белок 38А1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19Н9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38А1. В некоторых вариантах осуществления белок 19Н9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38А1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления тяжелую и легкую цепи кодируют в одном и том же векторе. В некоторых вариантах осуществления тяжелую и легкую цепи кодируют в различных векторах. В некоторых вариантах осуществления тяжелую цепь кодируют в первом векторе. В некоторых вариантах осуществления легкую цепь кодируют во втором векторе. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую

щую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор получают для трансфекции с использованием способа, включающего высевание 5×10^6 клеток Phoenix в 10 мм тканевой культуральный планшет, содержащий 5 мл клеточных культуральных сред. В некоторых вариантах осуществления вирус получают для трансфекции с использованием способа, дополнительно включающего трансфекцию клеток с использованием 10 мкг pLEV (лентивирусный вектор), содержащего scFV против PD-1, и 6 мкг pVSV-G, используя липофектамин. В некоторых вариантах осуществления вирус получают для трансфекции с использованием способа, дополнительно включающего сбор супернатанта и фильтрацию с использованием 70 мкМ уловителя в 15 мл пробирку после 60 мин. В некоторых вариантах осуществления вирус получают для трансфекции с использованием способа, включающего следующие стадии: 1) высевание 5×10^6 клеток Phoenix в 10 мм тканевой культуральный планшет, содержащий 5 мл клеточных культуральных сред; 2) трансфекция клеток с использованием 10 мкг pLEV (лентивирусный вектор), содержащего scFV против PD-1, и 6 мкг pVSV-G, используя липофектамин; и 3) после 60 ч сбор супернатанта и фильтрацию с использованием 70 мкМ уловителя в 15 мл пробирку.

Трансдукция Т-клеток

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки, в том числе, например, цитотоксические лимфоциты, трансдуцируют с использованием вирусного вектора (т.е. генетически модифицируют с использованием вирусного вектора). В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты представляют собой генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; фиг. 11A, фиг. 16A). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; фиг. 11B, фиг. 16B). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе гаммаретровируса. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе pMSCIV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 38A1.

В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирус-

ной основе, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе pMSCIV, кодирующий связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки, TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19H9. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки, TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 38A1. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки, TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления тяжелую и легкую цепи кодируют в одном и том же векторе. В некоторых вариантах осуществления тяжелую и легкую цепи кодируют в различных векторах. В некоторых вариантах осуществления тяжелую цепь кодируют в первом векторе. В некоторых вариантах осуществления легкую цепь кодируют во втором векторе. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1),

SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки трансдуцируют с использованием способа, включающего активацию 1×10^6 ТИЛ с использованием средства против CD3 в концентрации 300 нг/мл в 2 мл среды для культивирования ТИЛ в 12-луночном планшете. В некоторых вариантах осуществления способ трансдукции дополнительно включает разделение ТИЛ на две лунки и добавление 1 мл супернатанта (со стадии 3 при получении вирусов) в каждую лунку вместе с полибренном в концентрации 8 мкг/мл после 48 ч. В некоторых вариантах осуществления способ трансдукции дополнительно включает центрифугирование клеток в течение 30 мин при $800 \times g$ и $32^\circ C$. В некоторых вариантах осуществления способ трансдукции дополнительно включает удаление содержащей вирус среды и ресуспендирование клеточного осадка с использованием 2 мл свежих полных сред для культивирования и инкубацию клеток в течение 24 ч. В некоторых вариантах осуществления способ трансдукции дополнительно включает размножение клеток с использованием Размножения генетически модифицированных цитотоксических лимфоцитов, предоставленного далее, а также любого другого способа, известного в данной области для размножения ТИЛ, который можно применять для размножения цитотоксических лимфоцитов в популяции ТИЛ.

Образцы опухолей

В некоторых вариантах осуществления способ включает получение образца ткани опухоли у млекопитающего, где образец опухоли содержит ТИЛ, содержащие цитотоксические лимфоциты. Образец ткани опухоли можно получать из многих источников, включая в качестве неограничивающих примеров биопсию или некропсию опухоли. Образец ткани опухоли можно получать из любой злокачественной опухоли, включая в качестве неограничивающих примеров любые из злокачественных опухолей, описанных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой меланому. Образец ткани опухоли можно получать у любого млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления образец ткани опухоли получают у человека. В некоторых вариантах осуществления образец ткани опухоли может представлять собой фрагмент ткани опухоли. Образец ткани опухоли можно фрагментировать, например, посредством диссекции, чтобы предоставлять фрагмент ткани опухоли. В некоторых вариантах осуществления альтернативно или дополнительно, образец ткани опухоли, необязательно, можно расщеплять ферментативно или механически. Подходящие ферменты для фрагментации образца ткани опухоли включают, но не ограничиваясь этим, коллагеназу. В некоторых вариантах осуществления образец ткани опухоли фрагментируют без расщепления. Фрагмент ткани опухоли может быть любого подходящего размера. Предпочтительно, фрагмент ткани опухоли имеет раз-

мер приблизительно от 1 мм³ или меньше приблизительно до 8 мм³ или больше, приблизительно от 1 мм³ приблизительно до 4 мм³, приблизительно от 1 мм³ приблизительно до 2 мм³ или приблизительно 1 мм³.

Злокачественная опухоль, которую лечат с помощью раскрытых композиций и способов, в некоторых аспектах может представлять собой любую солидную опухоль, для которой можно получать ТЛ. Злокачественная опухоль также может быть метастатической и/или рецидивирующей. Злокачественная опухоль может представлять собой любую злокачественную опухоль, в том числе любую из острой лимфоцитарной злокачественной опухоли, острого миелолейкоза, альвеолярной рабдомиосаркомы, злокачественной опухоли кости, злокачественной опухоли головного мозга, злокачественной опухоли молочной железы, злокачественной опухоли ануса, анального канала или аноректума, злокачественной опухоли глаза, злокачественной опухоли внутривенного желчного протока, злокачественной опухоли суставов, злокачественной опухоли шеи, желчного пузыря или плевры, злокачественной опухоли носа, носовой полости или среднего уха, злокачественной опухоли ротовой полости, злокачественной опухоли вульвы, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронической миелоидной злокачественной опухоли, злокачественной опухоли ободочной кишки, злокачественной опухоли пищевода, злокачественной опухоли шейки матки, злокачественной опухоли пищеварительного тракта, злокачественной опухоли желудка, желудочно-кишечной карциноидной опухоли, глиомы, гепатобилиарной злокачественной опухоли, лимфомы Ходжкина, злокачественной опухоли подглоточника, злокачественной опухоли почки, злокачественной опухоли гортани, злокачественной опухоли печени, злокачественной опухоли легких, злокачественной мезотелиомы, меланомы, множественной миеломы, злокачественной опухоли носоглотки, неходжкинской лимфомы, злокачественной опухоли яичников, злокачественной опухоли поджелудочной железы, злокачественной опухоли брюшины, сальника и брыжейки, злокачественной опухоли глотки, злокачественной опухоли предстательной железы, злокачественной опухоли прямой кишки, злокачественной опухоли почки, злокачественной опухоли кожи, злокачественной опухоли тонкой кишки, злокачественной опухоли мягких тканей, злокачественной опухоли желудка, злокачественной опухоли яичек, злокачественной опухоли щитовидной железы, злокачественной опухоли мочеточника и злокачественной опухоли мочевого пузыря. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой меланому. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой метастатическую меланому.

Как используют в настоящем описании, термин "млекопитающее" относится к любому млекопитающему, включая в качестве неограничивающих примеров млекопитающих отряда Rodentia, таких как мыши и хомяки, и млекопитающих отряда Logomorpha, таких как кролики. Предпочтительно млекопитающие относятся к отряду Carnivora, в том числе кошачьи (кошки) и псовые (собаки). Более предпочтительно млекопитающие относятся к отряду Artiodactyla, в том числе быкам (коровы) и свиньям (свиньи) или отряду Perissodactyla, в том числе лошадиные (лошади). Наиболее предпочтительно млекопитающие относятся к отряду приматов, Cebidae или "Simioids" (мартышки) или к отряду Anthropoids (человек и человекообразные обезьяны). В некоторых вариантах осуществления млекопитающим является человек.

Общие способы размножения цитотоксических лимфоцитов, содержащих ТЛ

Получение цитотоксических лимфоцитов, содержащих инфильтрирующие опухоль лимфоциты (ТЛ), в целом представляет собой 2-стадийный процесс: 1) этап предварительного REP (быстрого размножения), на котором растут клетки в стандартных лабораторных средах, таких как RPMI, и обрабатывают ТЛ с использованием реактивов, таких как облученные клетки-кормушки и антитела против CD3, чтобы достигать желаемого эффекта; и 2) этап REP, где размножают содержащий ТЛ цитотоксический лимфоцит в достаточно большом количестве культуры, чтобы лечить пациентов. Для этапа REP необходимы реактивы марки cGMP (существующие надлежащие процедуры производства) и 30-40 л среды для культивирования. Однако на предварительном этапе REP можно использовать реактивы для лабораторий (при допущении, что лабораторные реактивы разбавляют в течение этапа REP), что упрощает внедрение альтернативных стратегий для усовершенствования получения ТЛ. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления раскрытый TLR агонист и/или пептид или пептидомиметики можно включать в среду для культивирования в течение предварительного этапа REP. Предварительная культура REP может в некоторых вариантах осуществления содержать IL-2.

В некоторых вариантах осуществления АСТ можно осуществлять посредством (i) получения аутологичных содержащих ТЛ цитотоксических лимфоцитов у млекопитающих, (ii) культивирования (включая, например, REP) аутологичных содержащих ТЛ цитотоксических лимфоцитов для того, чтобы получить размноженные лимфоциты, и (iii) введения размноженных содержащих ТЛ цитотоксических лимфоцитов млекопитающему. В некоторых вариантах осуществления содержащие ТЛ цитотоксические лимфоциты происходят из опухоли, т.е. они представляют собой содержащие ТЛ цитотоксические, и их выделяют у млекопитающего подлежащего лечению, т.е. аутологичный перенос. В некоторых вариантах осуществления аутологичные содержащие ТЛ цитотоксические лимфоциты представляют собой генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты. В некоторых вариантах осуществления аутологичные цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления аутологичные лимфоциты представляют собой генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты с использовани-

ем вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления аутологичные лимфоциты генетически модифицируют до или после культивирования, но перед введением млекопитающему. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты представляют собой генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; фиг. 11A, фиг. 16A). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; фиг. 11B, фиг. 16B). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе гаммаретровируса. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе rMSCIV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19H9. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 38A1. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления тяжелую и легкую цепи кодируют в одном и том же векторе. В некоторых вариантах осуществления тяжелую и легкую цепи кодируют в различных векторах. В некоторых вариантах осуществления тяжелую цепь кодируют в первом векторе. В некоторых вариантах осуществления легкую цепь кодируют во втором векторе. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент,

содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

В некоторых вариантах осуществления аутологичный АСТ, как раскрыто в настоящем описании, также можно осуществлять посредством (i) культивирования аутологичных содержащих TIL цитотоксических лимфоцитов для того, чтобы получать размноженные лимфоциты; (ii) необязательного введения не миелоаблятивной лимфоистощающей химиотерапии млекопитающему; и (iii) после необязательного введения не миелоаблятивной лимфоистощающей химиотерапии, введения размноженных содержащих TIL цитотоксических лимфоцитов млекопитающему. Аутологичные TIL можно получать из стромы иссеченных опухолей. Для этого у пациентов получают образцы опухолей и получают суспензию отдельных клеток. Суспензию отдельных клеток можно получать любым подходящим образом, например, механически (деагрегирование опухоли с использованием, например, gentleMACS.TM. Dissociator, Miltenyi Biotec, Auburn, Calif.) или ферментативно (например, коллагеназа или ДНКаза). В некоторых вариантах осуществления аутологичные цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления аутологичные лимфоциты представляют собой генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты с использованием вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления аутологичные лимфоциты генетически модифицируют до или после культивирования, но перед введением млекопи-

тающему. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты представляют собой генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; фиг. 11A, 16A). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; фиг. 11B, 16B). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе гаммаретровируса. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе pMSCIV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19H9. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 38A1. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления тяжелую и легкую цепи кодируют в одном и том же векторе. В некоторых вариантах осуществления тяжелую и легкую цепи кодируют в различных векторах. В некоторых вариантах осуществления тяжелую цепь кодируют в первом векторе. В некоторых вариантах осуществления легкую цепь кодируют во втором векторе. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок

представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

Размножение лимфоцитов, в том числе инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, таких как Т-клетки, можно выполнять с помощью любого из множества способов, как известно в данной области, в том числе тех, что описаны в настоящем описании далее. Например, Т-клетки можно быстро размножить с использованием неспецифической стимуляции Т-клеточных рецепторов в присутствии лимфоцитарных кормушек и интерлейкина-2 (IL-2), IL-7, IL-15, IL-21 или их сочетаний. Неспецифический стимул Т-клеточных рецепторов может, например, включать приблизительно 30 нг/мл ОКТ3, моноклонального антитела мыши против CD3 (доступно в Ortho-McNeilR™, Raritan, N.J. или Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Альтернативно, Т-клетки можно быстро размножить посредством стимуляции мононуклеарных клеток периферической крови (ПБК) *in vitro* с использованием одного или более антигенов (включая их антигенные части, такие как эпитоп(ы), или клетки злокачественной опухоли, которые необязательно можно экспрессировать из вектора, такой как связывающий лейкоцитарный антиген человека A2 (HLA-A2) пептид, например, приблизительно 0,3 мкМ MART-1:26-35 (27 L) или gp100:209-217 (210M)), в присутствии Т-клеточного фактора роста, например, приблизительно 200-400 мкл/мл, например, 300 МЕ/мл IL-2 или IL-15, причем IL-2 предпочтителен. Индуцируемые *in vitro* Т-клетки быстро размножаются посредством повторной стимуляции с использованием того же антигена(ов) злокачественной опухоли, импульсно подаваемого на HLA-A2-экспрессирующие антигенпредставляющие клетки. Альтернативно, Т-клетки можно повторно стимулировать с использованием облученных аутологических

лимфоцитов или с использованием облученных HLA-A2+ аллогенных лимфоцитов и IL-2, например. См., например, публикацию международного патента WO 2015/143328, включенную по ссылке в настоящее описание для всех целей.

Специфическую опухолевую реакционную способность размноженных TIL можно тестировать любым известным в данной области способом, например, посредством измерения высвобождения цитокинов (например, интерферона- γ) после совместного культивирования с опухолевыми клетками. В одном из вариантов осуществления способ аутологичного АСТ включает обогащение культивируемых TIL по CD8+ T-клеткам перед быстрым размножением клеток. После культивирования TIL в IL-2, T-клетки обедняют по CD4+ клеткам и обогащают по CD8+ клеткам, используя, например, разделение на CD8-микрогранулах (например, с использованием системы микрогранул CliniMACS⁺CD8 (Miltenyi Biotec)). В некоторых вариантах осуществления T-клеточный фактор роста, который способствует росту и активации аутологичных T-клеток, вводят млекопитающему или параллельно с аутологичными T-клетками или после аутологичных T-клеток. T-клеточный фактор роста может представлять собой любой подходящий фактор роста, который способствует росту и активации аутологичных T-клеток. Примеры подходящих T-клеточных факторов роста включают интерлейкин (IL)-2, IL-7, IL-15, IL-12 и IL-21, которые можно использовать отдельно или в различных комбинациях, таких как IL-2 и IL-7, IL-2 и IL-15, IL-7 и IL-15, IL-2, IL-7 и IL-15, IL-12 и IL-7, IL-12 и IL-15 или IL-12 и IL2. В некоторых вариантах осуществления усиление 4-1BB костимуляции можно использовать для увеличения активного размножения TIL для адоптивной клеточной терапии.

Размножение генетически модифицированных цитотоксических лимфоцитов

Размножение содержащих TIL цитотоксических лимфоцитов и/или размножение (т.е. REP) генетически модифицированных цитотоксических лимфоцитов для того, чтобы предоставлять популяцию генетически модифицированных цитотоксических лимфоцитов, включает культивирование содержащих TIL цитотоксических лимфоцитов *ex vivo*, чтобы предоставлять популяцию содержащих TIL цитотоксических лимфоцитов, например, для повторного введения субъекту (в том числе, например, млекопитающему). В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты культивируют в подходящих средах, содержащих облученные мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) (клетки-кормушки), выделенные посредством лейкофереза у субъекта или у аллогенных доноров, и подходящие реактивы, такие как интерлейкин-2 (IL-2), например, IL-2 человека, и ОКТ3 (антитело против CD3). В качестве альтернативы использованию PBMC, искусственные антигенпредставляющие клетки можно использовать при размножении цитотоксических лимфоцитов, например, клетки K562, генетически модифицированные для того, чтобы экспрессировать Fc рецепторы человека CD32 и CD64 так, что клетки K562 могут связывать и презентировать моноклональные антитела α CD3 и α CD28. Такие искусственные антигенпредставляющие клетки, в том числе искусственные антигенпредставляющие клетки, экспрессирующие различные костимуляторные молекулы, описаны, например, в Turtle and Riddell Cancer J. 2010 Jul-Aug; 16(4): 374-381.

В качестве части стадии размножения или в качестве дополнительной стадии(й), одну или более стадий отбора можно осуществлять для обогащения по TIL и/или цитотоксическим лимфоцитам, представляющим интерес, (например, цитотоксическим лимфоцитам, экспрессирующим рецепторы для одного или более опухолеассоциированных антигенов), например, через один или более иммунологических анализов.

В дополнение к TIL, цитотоксические лимфоциты, макрофаги, моноциты и естественные киллерные (NK) клетки также можно получать из образца ткани опухоли, культивировать и размножать, как раскрыто в настоящем описании для TIL.

Соответственно способ также может включать введение макрофагов, моноцитов и естественных киллерных (NK) клеток млекопитающему. В некоторых вариантах осуществления способы можно использовать для размножения цитотоксических лимфоцитов, например, в том числе стадии (стадий) размножения REP.

После получения образца опухоли, который содержит содержащие TIL цитотоксические лимфоциты, TIL и/или цитотоксические лимфоциты размножают. В некоторых вариантах осуществления способ размножения содержащих TIL цитотоксических лимфоцитов и/или генетически модифицированных цитотоксических лимфоцитов включает (i) культивирование (т.е. предварительное REP) содержащих TIL цитотоксических лимфоцитов, в том числе с использованием IL-2; (ii) размножение (т.е. REP) культивируемых цитотоксических лимфоцитов с использованием антитела ОКТ3, IL-2 и лимфоцитов-кормушек, где культивируемые цитотоксические лимфоциты обогащают по CD8+ T-клеткам перед размножением цитотоксических лимфоцитов; (iii) необязательное введение млекопитающему не миелоаблятивной лимфоистоощающей химиотерапии; и (iv) после необязательного введения не миелоаблятивной лимфоистоощающей химиотерапии, введение млекопитающему размноженных цитотоксических лимфоцитов, где цитотоксические лимфоциты, вводимые млекопитающему, имеют возраст приблизительно от 19 приблизительно до 35 суток и не проходили скрининг по специфической опухолевой реакционной способности, после чего способствуют регрессии злокачественной опухоли у млекопитающего. В некоторых вариан-

тах осуществления вводимые цитотоксические лимфоциты имеют возраст меньше приблизительно 35 суток, например, возраст приблизительно от 19 приблизительно до 26 суток. См., например, те способы, которые описаны в патенте США № 8383099, а также способы, предоставленные в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют после получения образца ткани опухоли у млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют до или после культивирования содержащих TIL цитотоксических лимфоцитов. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют до или после размножения культивируемых цитотоксических лимфоцитов с использованием антитела ОКТ3, IL-2 и лимфоцитов-кормушек, где культивируемые цитотоксические лимфоциты обогащают по CD8+ Т-клеткам перед размножением TIL и/или цитотоксических лимфоцитов. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют перед введением млекопитающему. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты представляют собой генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют с использованием вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды кодируют в одном и том же векторе. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды кодируют в различных векторах. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид кодируют в первом векторе. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид кодируют во втором векторе. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; фиг. 11A, 16A). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; фиг. 11B, 16B). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе гаммаретровируса. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе pMSCIV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19H9. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 38A1. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более вы-

В некоторых вариантах осуществления полагают, что цитотоксические лимфоциты, которые имеют возраст приблизительно от 19 до 35 суток, обеспечивают усовершенствованную пролиферацию, выживаемость и противоопухолевую активность *in vivo* по сравнению с цитотоксическими лимфоцитами, которые имеют возраст приблизительно 44 суток или больше. Кроме того, в вариантах осуществления, которые включают не миелоаблятивную химиотерапию, патентоспособные способы можно благоприятно использовать для того, чтобы лечить пациентов, которые не подходят для лечения, которое включает облучение всего организма (ТВИ), таких как, например, пациенты, которые уже прошли миелоаблятивную терапию, например, лучевую терапию, перед лечением; пациенты с сопутствующими состояниями; и пациенты с меньше чем 2×10^6 CD34⁺ клеток/кг.

В некоторых вариантах осуществления период времени, необходимый для того, чтобы создавать цитотоксические лимфоциты для адоптивной клеточной терапии (АСТ), можно укорачивать от усредненного в приблизительно 44 суток до диапазона приблизительно от 19 до 35 суток (или меньше приблизительно 35 суток, например, приблизительно от 19 до 29 суток или приблизительно от 19 до 26 суток). Соответственно, больше пациентов можно лечить прежде, чем тяжесть их заболевания прогрессирует до этапа, на котором введение АСТ далее может быть не безопасным или возможным. В некоторых вариантах осуществления способы не требуют тестирования специфической антигенной реактивности *in vitro* перед введением, патентоспособные способы уменьшают время, стоимость и трудовые ресурсы, связанные с лечением пациентов.

Дополнительно патентоспособные способы позволяют использовать введение цитотоксических лимфоцитов, которые объединены из не сортированных культур, вместо тех, которые получают из микрокультур.

Вариант осуществления способа включает культивирование аутологичных цитотоксических лимфоцитов. У пациентов получают образцы опухолей, и получают суспензию отдельных клеток. Суспензию отдельных клеток можно получать любым подходящим образом, например, механически (деагрегирование опухоли с использованием, например, gentleMACS™ Dissociator, Miltenyi Biotec, Auburn, Calif.) или ферментативно (например, коллагеназа или ДНКаза). Суспензии отдельных клеток из продуктов ферментативного расщепления опухолей культивируют в интерлейкине-2 (IL-2), например, в нескольких лунках. Клетки культивируют до конfluence (например, приблизительно 2×10^6 лимфоцитов), например, приблизительно от 5 до 21 суток, предпочтительно приблизительно от 10 до 14 суток. Например, клетки можно культивировать от 5 суток, 5,5 суток или 5,8 суток до 21 суток, 21,5 суток или 21,8 суток, предпочтительно от 10 суток, 10,5 суток или 10,8 суток до 14 суток, 14,5 суток.

В некоторых вариантах осуществления способ включает размножение культивируемых содержащих ТП цитотоксических лимфоцитов. Культивируемые содержащие ТП цитотоксические лимфоциты объединяют и быстро размножают. Быстрое размножение обеспечивает увеличение числа антигенспецифических Т-клеток по меньшей мере приблизительно в 50 раз (например, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз или больше) в течение периода приблизительно от 10 до 14 суток и в некоторых вариантах осуществления приблизительно 14 суток. В некоторых вариантах осуществления быстрое размножение обеспечивает увеличение по меньшей мере приблизительно в 200 раз (например, 200 раз, 300 раз, 400 раз, 500 раз, 600 раз, 700 раз, 800 раз, 900 раз или больше) в течение периода приблизительно от 10 до 14 суток, в некоторых вариантах осуществления приблизительно 14 суток. В некоторых вариантах осуществления быстрое размножение обеспечивает увеличение по меньшей мере приблизительно в 1000 раз в течение периода приблизительно от 10 до 14 суток, в некоторых вариантах осуществления приблизительно 14 суток. В некоторых вариантах осуществления быстрое размножение обеспечивает увеличение приблизительно в 1000 раз в течение периода приблизительно 14 суток. В некоторых вариантах осуществления культивируемые содержащие ТП цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты представляют собой генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления культивируемые содержащие ТП цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют с использованием вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; фиг. 11A, фиг. 16A). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; фиг. 11B, фиг. 16B). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе гаммаретровируса. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе рMSCIV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный век-

тор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19H9. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 38A1. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95%

или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

Размножение можно выполнять посредством любого из множества способов, как известно в данной области. Например, цитотоксические лимфоциты можно быстро размножить с использованием неспецифической стимуляции Т-клеточных рецепторов в присутствии лимфоцитов-кормушек и интерлейкина-2 (IL-2) или интерлейкина-15 (IL-15), причем IL-2 предпочтителен.

Неспецифический стимул Т-клеточных рецепторов может включать приблизительно 30 нг/мл ОКТ3, моноклонального антитела мыши против CD3 (доступно в Ortho-McNeilR™, Raritan, N.J.). Альтернативно, цитотоксические лимфоциты можно быстро размножить посредством стимуляции мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) *in vitro* с использованием одного или более антигенов (включая их антигенные части, такие как эпитоп(ы), или клетки) злокачественной опухоли, которые обязательно можно экспрессировать из вектора, такой как связывающий лейкоцитарный антиген человека A2 (HLA-A2) пептид, например, 0,3 мкМ MART-1:26-35 (27 L) или gp100:209-217 (210M), в присутствии Т-клеточного фактора роста, такого как 300 МЕ/мл IL-2 или IL-15. В некоторых вариантах осуществления Т-клеточный фактор роста IL-2 предпочтителен. Индуцируемые *in vitro* цитотоксические лимфоциты быстро размножают посредством повторной стимуляции с использованием того же антигена(ов) злокачественной опухоли, который импульсно подают на HLA-A2-экспрессирующие антигенпредставляющие клетки. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты, например, можно повторно стимулировать с использованием облученных аутологических лимфоцитов или облученных HLA-A2+ аллогенных лимфоцитов и IL-2.

В некоторых вариантах осуществления Т-клеточный фактор роста, который способствует росту и активации TIL и/или цитотоксических лимфоцитов, вводят млекопитающему или параллельно с TIL или после TIL. Т-клеточный фактор роста может представлять собой любой подходящий фактор роста, который способствует росту и активации TIL. Примеры подходящих Т-клеточных факторов роста включают интерлейкин (IL)-2, IL-7, IL-15 и IL-12, которые можно использовать отдельно или в различных комбинациях, таких как IL-2 и IL-7, IL-2 и IL-15, IL-7 и IL-15, IL-2, IL-7 и IL-15, IL-12 и IL-7, IL-12 и IL-15 или IL-12 и IL-2. IL-2 представляет собой предпочтительный Т-клеточный фактор роста.

В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты дополнительно модифицируют для того, чтобы экспрессировать Т-клеточный фактор роста, который способствует росту и активации TIL и/или цитотоксических лимфоцитов. Подходящие Т-клеточные факторы роста включают, например, любые из описанных выше. Подходящие способы модификации известны в данной области. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3-е изд., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001; и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994. В некоторых вариантах осуществления модифицированные TIL и/или цитотоксические лимфоциты экспрессируют Т-клеточный фактор роста на высоких уровнях.

Кодирующие Т-клеточные факторы роста последовательности, например, таковые для IL-12, легко доступны в данной области, как промоторы, функциональная связь которых с кодирующей Т-клеточный фактор роста последовательностью способствует экспрессии на высоком уровне. В некоторых вариантах осуществления ТИЛ и/или цитотоксические лимфоциты можно модифицировать для того, чтобы экспрессировать IL-12, как описано в публикации патентной заявки всемирной организации интеллектуальной собственности № WO 2010/126766, которая включена в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления два цитокина могут быть более эффективными, чем один цитокин, и, в некоторых вариантах осуществления три цитокина, например, IL-2, IL-7 и IL-15, могут быть более эффективными, чем любые два цитокина. Полагают, что IL-15 усиливает опухолеспецифический ответ CD8+ Т-клеток. В связи с этим, введение IL-15-культивируемых клеток с IL-2 (например, болюсная инъекция) может быть особенно эффективным. В некоторых вариантах осуществления ТИЛ и/или цитотоксические лимфоциты, модифицированные для того, чтобы экспрессировать IL-15, можно вводить с IL-2 в виде болюсной инъекции.

Т-клеточный фактор роста можно вводить через любой подходящий путь. В вариантах осуществления, где вводят больше чем один Т-клеточный фактор роста, их можно вводить одновременно или последовательно, в любом порядке, и через один и тот же путь или различные пути. В некоторых вариантах осуществления Т-клеточный фактор роста, такой как IL-2, вводят внутривенно в виде болюсной инъекции. В некоторых вариантах осуществления доза Т-клеточного фактора роста, такого как IL-2, представляет собой то, что средние специалисты в данной области сочтут высоким. В некоторых вариантах осуществления дозу IL-2 приблизительно 720000 МЕ/кг вводят три раза в сутки до толерантности, в частности, когда злокачественная опухоль представляет собой меланому. В некоторых вариантах осуществления вводят приблизительно от 5 приблизительно до 15 доз IL-2, усредненно приблизительно 8 доз.

ТИЛ и/или цитотоксические лимфоциты могут распознавать любые уникальные антигены, продуцируемые в результате оценочно 10000 генетических мутаций, которые кодирует геном каждой опухолевой клетки. Однако антиген не должен быть уникальным. ТИЛ и/или цитотоксические лимфоциты могут распознавать один или более антигенов злокачественной опухоли, в том числе антигенную часть одного или более антигенов, такую как эпитоп, или клетки злокачественной опухоли. "Антиген злокачественной опухоли" предназначен для того, чтобы охватывать все указанные выше антигены. Если злокачественная опухоль представляет собой меланому, такую как метастатическая меланома, ТИЛ и/или цитотоксические лимфоциты могут распознавать MART-1 (такой как MART-1:26-35 (27L)), gp100 (такой как gp100:209-217 (210M)) или "уникальный" или пациент-специфический антиген, получаемый из мутации, кодируемой опухолью. Другие подходящие антигены меланомы, которые может распознавать ТИЛ, могут включать, но не ограничиваясь этим, тирозиназу, связанный с тирозиназой белок (TRP)1, TRP2 и MAGE. ТИЛ также может распознавать антигены, например, такие как NY-ESO-1, теломераза, p53, HER2/neu, эмбриональный опухолевый антиген или специфический антиген предстательной железы, для лечения карциномы легкого, злокачественной опухоли молочной железы, злокачественной опухоли ободочной кишки, злокачественной опухоли предстательной железы и т.п.

В некоторых вариантах осуществления способ включает необязательное введение млекопитающему не миелоаблятивной лимфоистоощающей химиотерапии. Не миелоаблятивная лимфоистоощающая химиотерапия может представлять собой любую такую подходящую терапию, которую можно вводить через любой подходящий путь. Не миелоаблятивная лимфоистоощающая химиотерапия может включать, например, введение циклофосфида и флударабина, в частности, если злокачественной опухолью является меланома, которая может быть метастатической. В некоторых вариантах осуществления путь введения циклофосфида и флударабина является внутривенными. Аналогичным образом, можно вводить любую подходящую дозу циклофосфида и флударабина. В некоторых вариантах осуществления приблизительно 60 мг/кг циклофосфида вводят в течение двух суток, после чего приблизительно 25 мг/м² флударабина вводят в течение пяти суток. В некоторых вариантах осуществления приблизительно 60 мг/кг циклофосфида вводят в течение двух суток, после чего приблизительно 25 мг/м² флударабина вводят в течение пяти суток, и злокачественной опухолью/опухолью является меланома.

В некоторых вариантах осуществления способ включает, после необязательного введения не миелоаблятивной лимфоистоощающей химиотерапии, введение млекопитающему размноженных цитотоксических лимфоцитов, где цитотоксические лимфоциты, вводимые млекопитающему, имеют возраст приблизительно от 19 приблизительно до 35 суток. Например, вводимые цитотоксические лимфоциты могут иметь возраст от 19 суток, 19,5 суток или 19,8 суток до 35 суток, 35,5 суток или 35,8 суток. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты, вводимые млекопитающему, имеют возраст приблизительно от 19 суток приблизительно до 29 суток или приблизительно от 23 суток приблизительно до 29 суток или приблизительно 26 суток. Например, вводимые цитотоксические лимфоциты могут иметь возраст от 19 суток, 19,5 суток или 19,8 суток до 29, 29,5 или 29,8 суток; от 23, 23,5 или 23,8 до 29, 29,5 или 29,8 суток; или 26, 26,5 или 26,8 суток. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты, которые вводят млекопитающему, представляют собой "молодые" цитотоксические лимфоциты, т.е. минимально культивируемые цитотоксические лимфоциты или цитотоксические лимфоциты в возрасте от 19 суток приблизительно до 29 суток или приблизительно 23 суток приблизительно до 29

суток или приблизительно 26 суток.

Культуры молодых цитотоксических лимфоцитов, которые вводят млекопитающему в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения, благоприятно обладают признаками, связанными персистенцией *in vivo*, пролиферацией и противоопухолевой активностью. Например, культуры молодых цитотоксических лимфоцитов имеют более высокую экспрессию CD27 и/или CD28, чем цитотоксические лимфоциты, которые имеют возраст приблизительно 44 суток. Без ограничения конкретной теорией, полагают, что CD27 и CD28 связаны с пролиферацией, персистенцией *in vivo* и менее дифференцированным состоянием цитотоксических лимфоцитов (хотя, без связи с теорией, увеличенную дифференцировку цитотоксических лимфоцитов считают отрицательно влияющей на способность цитотоксических лимфоцитов функционировать *in vivo*). Цитотоксические лимфоциты, экспрессирующие более высокие уровни CD27, считают обладающими более хорошей противоопухолевой активностью, чем клетки с низким CD27. Кроме того, культуры молодых цитотоксических лимфоцитов (например, в возрасте от 19 суток приблизительно до 29 суток или приблизительно от 23 суток приблизительно до 29 суток или приблизительно 26 суток) имеют более высокую частоту CD4+ клеток, чем цитотоксические лимфоциты, которые имеют возраст приблизительно 44 суток.

Кроме того, культуры молодых цитотоксических лимфоцитов имеют среднюю длину теломеров, которая больше таковой у цитотоксических лимфоцитов, которые имеют возраст приблизительно 44 суток. Без ограничения конкретной теорией, полагают, что цитотоксические лимфоциты теряют оценочно длину теломеров 0,8 т.о. в неделю в культуре и что культуры молодых цитотоксических лимфоцитов имеют теломеры, которые приблизительно на 1,4 т.о. длиннее, чем цитотоксические лимфоциты, которые имеют возраст приблизительно 44 суток. Без ограничения конкретной теорией, полагают, что более длинные теломеры связаны с положительными объективными клиническими ответами у субъектов и персистенцией клеток *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты не тестируют на специфическую опухолевую реакционную способность для того, чтобы идентифицировать опухолереактивные цитотоксические лимфоциты перед введением пациенту.

Специфическую опухолевую реакционную способность можно тестировать с помощью любого известного в данной области способа, например, посредством измерения высвобождения цитокинов (например, интерферона- γ), после совместного культивирования с опухолевыми клетками. Патентоспособные способы благоприятно позволяют содействовать регрессии злокачественной опухоли у млекопитающего посредством введения цитотоксических лимфоцитов млекопитающему без необходимости предшествующего скрининга специфического распознавания опухоли. Варианты осуществления способов, при желании, могут включать тестирование цитотоксических лимфоцитов на активность не антиген-специфическим образом перед введением цитотоксических лимфоцитов млекопитающему. В некоторых вариантах осуществления активность цитотоксических лимфоцитов можно необязательно тестировать, например, посредством анализа неспецифической активности, в котором измеряют высвобождение цитокинов после ОКТ3 стимуляции. Т-клетки можно считать активными, например, если высвобождение интерферона (IFN) составляет больше приблизительно 50 пг/мл, больше приблизительно 100 пг/мл, больше приблизительно 150 пг/мл или больше приблизительно 200 пг/мл. Менее желаемый вариант осуществления способа включает тестирование размноженных цитотоксических лимфоцитов на специфическую опухолевую реакционную способность для того, чтобы идентифицировать опухолереактивные цитотоксические лимфоциты.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу содействия регрессии злокачественной опухоли у млекопитающего, который включает (i) культивирование (т.е. предварительное РЕР) аутологичных цитотоксических лимфоцитов и/или генетически модифицированных цитотоксических лимфоцитов (в некоторых вариантах осуществления аутологичных генетически модифицированных цитотоксических лимфоцитов), в том числе с использованием IL-2; (ii) размножение культивируемых цитотоксических лимфоцитов с использованием антитела ОКТ3, IL-2 и лимфоцитов-кормушек, где культивируемые цитотоксические лимфоциты обогащают по CD8+ Т-клеткам перед размножением цитотоксических лимфоцитов; (iii) необязательно введение млекопитающему не миелоаблятивной лимфоистощающей химиотерапии; и (iv) после необязательного введения не миелоаблятивной лимфоистощающей химиотерапии, введение млекопитающему размноженных цитотоксических лимфоцитов, где цитотоксические лимфоциты, вводимые млекопитающему, имеют возраст приблизительно от 19 суток приблизительно до 29 суток или приблизительно от 23 суток приблизительно до 29 суток или приблизительно 26 суток, после чего способствуют регрессии злокачественной опухоли у млекопитающего. Например, цитотоксические лимфоциты, вводимые млекопитающему, могут иметь возраст от 19 суток приблизительно до 29 суток или приблизительно от 23 суток приблизительно до 29 суток. В некоторых вариантах осуществления возраст составляет приблизительно от 19 суток приблизительно до 29 суток или приблизительно от 23 суток приблизительно до 29 суток или приблизительно 26 суток. В некоторых вариантах осуществления культивируемые содержащие ТIL цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты представляют собой генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты. В некоторых вариантах осуществления цито-

токсические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления культивируемые содержащие TIL цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют с использованием вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; фиг. 11A, 16A). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; фиг. 11B, 16B). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе гаммаретровируса. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе pMSCIV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19H9. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 38A1. В некоторых вариантах осуществления культивируемые содержащие TIL цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют до или после культивирования. В некоторых вариантах осуществления культивируемые содержащие TIL цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют до или после размножения культивируемых содержащих TIL цитотоксических лимфоцитов с использованием антитела ОКТ3, IL-2 и лимфоцитов-кормушек, где культивируемые цитотоксические лимфоциты обогащают по CD8+ Т-клеткам перед размножением цитотоксических лимфоцитов. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет

собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

В некоторых вариантах осуществления способ включает культивирование (например, предварительное REP) аутологичных Т-клеток, как раскрыто в настоящем описании, приблизительно от 19 суток приблизительно до 29 суток или приблизительно от 23 суток приблизительно до 29 суток или приблизительно 26 суток. Способ дополнительно включает размножение (например, REP) культивируемых цитотоксических лимфоцитов и необязательное введение млекопитающему не миелоаблятивной лимфоистощающей химиотерапии, как раскрыто в настоящем описании. После необязательного введения не миелоаблятивной лимфоистощающей химиотерапии, способ включает введение млекопитающему размноженных цитотоксических лимфоцитов, как раскрыто в настоящем описании, после чего способствуют регрессии злокачественной опухоли у млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления способа, вводимые цитотоксические лимфоциты не проходили скрининг по специфической опухолевой реакционной способности. В некоторых вариантах осуществления размноженные цитотоксические лимфоциты, вводимые млекопитающему, имеют возраст приблизительно от 19 суток приблизительно до 29 суток или приблизительно от 23 суток приблизительно до 29 суток или приблизительно 26 суток. Например, вводимые цитотоксические лимфоциты могут иметь возраст от 19 суток, 19,5 суток или 19,8 суток до 29, 29,5 или 29,8 суток; от 23, 23,5 или 23,8 до 29, 29,5 или 29,8 суток; или 26, 26,5 или 26,8 суток.

В некоторых вариантах осуществления способ включает обогащение культивируемых Т-клеток, содержащих цитотоксические лимфоциты, по CD8+ Т-клеткам перед быстрым размножением клеток. После культивирования содержащих TIL цитотоксических лимфоцитов в IL-2, содержащие TIL цитотоксические лимфоциты истощают по CD4+ клеткам и обогащают по CD8+ клеткам с использованием, например, разделения CD8-микрогранулах (например, с использованием системы CD8-микробус CliniMACS® Plus (коммерчески доступна в Miltenyi Biotec)). В некоторых вариантах осуществления CD4+ и CD25+ регуляторные Т-клетки могут затруднять противоопухолевые ответы. В некоторых вариантах осуществления обогащение культивируемых цитотоксических лимфоцитов по CD8+ цитотоксическим лимфоцитам и снижение или устранение CD4+ клеток позволяют усовершенствовать влияние адоптивно перенесенных противоопухолевых CD8+ клеток, усовершенствовать частоты ответа у пациентов и/или снизить наблюдаемую токсичность от продуцирования цитокинов CD4+ клетками. В некоторых вариантах осуществления CD8+ обогащение некоторых Т-клеточных культур обнаруживает распознавание опухоли *in vitro*, которое может не быть очевидным в не сортированной культуре, и усовершенствованное распознавание опухоли *in vitro* в других культурах. В некоторых вариантах осуществления обогащенные CD8+ молодые цитотоксические лимфоциты могут функционировать более надежно и предсказуемо при быстром размножении в клиническом масштабе, чем не сортированные Т-клетки.

Размножение генетически модифицированных цитотоксических лимфоцитов с использованием газопроницаемых контейнеров

Вариант осуществления изобретения относится к способу содействия регрессии злокачественной опухоли у млекопитающего, который включает получение образца ткани опухоли у млекопитающего; культивирование (т.е. предварительное REP) образца ткани опухоли в первом газопроницаемом контейнере, в котором содержится клеточная среда; получение цитотоксических лимфоцитов из образца ткани опухоли; размножение (т.е. REP) множества цитотоксических лимфоцитов во втором газопроницаемом контейнере, в котором содержится клеточная среда, с использованием облученных аллогенных клеток-кормушек и/или облученных аутологичных клеток-кормушек; и введение размноженного множества цитотоксических лимфоцитов млекопитающему. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют после выделения из образца ткани опухоли, но перед культивированием в указанном первом газопроницаемом контейнере. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют после культивирования в указанном первом газопроницаемом контейнере, но перед культивированием в указанном втором газопроницаемом контейнере. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют перед введением размноженного множества цитотоксических лимфоцитов млекопитающему. См., например, способы, которые описаны в публикации патента США 2017/0152 478, а также те, которые описаны в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют с использованием вектора. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; фиг. 11A, 16A). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; фиг. 11B, 16B). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе гаммаретровируса. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе pMSCIV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19H9. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 38A1. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаруже-

нию с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления тяжелую и легкую цепи кодируют в одном и том же векторе. В некоторых вариантах осуществления тяжелую и легкую цепи кодируют в различных векторах. В некоторых вариантах осуществления тяжелую цепь кодируют в первом векторе. В некоторых вариантах осуществления легкую цепь кодируют во втором векторе. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержа-

ший легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

В некоторых вариантах осуществления данные способы содействия регрессии злокачественной опухоли с использованием цитотоксических лимфоцитов и/или генетически модифицированных цитотоксических лимфоцитов, которые размножали с использованием газопроницаемых контейнеров, являются более простыми, требующими меньше трудозатрат, требуют меньше реактивов, и их можно осуществлять с использованием более простого оборудования, чем процедуры с использованием газонепроницаемых контейнеров (например, Т-колбы или колбы Т-175, мешки и многолуночные планшеты). Кроме того, газопроницаемые контейнеры могут в некоторых вариантах осуществления защищать клетки от микробной контаминации более эффективно, чем газонепроницаемые контейнеры, которые могут представлять собой "открытые" системы. Кроме того, способы с использованием газопроницаемых контейнеров позволяют в некоторых вариантах осуществления снижать число контейнеров, которые используют, по сравнению со способами с использованием газонепроницаемых контейнеров, тем самым уменьшая количество труда, необходимого для того, чтобы осуществлять способы, а также снижая риск микробной контаминации. Таким образом, получение клеток в газопроницаемых контейнерах может быть более подходящим для соответствия условиям существующих надлежащих процедур производства (cGMP), которые необходимы, например, для фазы III клинических исследований. В некоторых вариантах осуществления способы с использованием газопроницаемых контейнеров уменьшают конечный объем культуры ниже объема, получаемого с использованием газонепроницаемых контейнеров, что позволяет снижать инкубатора, необходимую для роста клеток, снижает количество реактивов (например, клеточной культуральной среды и добавок), необходимых для роста клеток, и упрощает оборудование и/или процедуры для концентрирования и промывания клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки можно кормить менее часто в газопроницаемых контейнерах (например, приблизительно каждые 3-4 суток), чем в газонепроницаемых контейнерах (например, через сутки), в частности, когда клетки и/или образец ткани опухоли культивируют погруженными под по меньшей мере приблизительно 1,3 см клеточной культуральной среды в газопроницаемом контейнере. В некоторых вариантах осуществления манипулировать клетками в газопроницаемых контейнерах можно менее часто, чем клетками в газонепроницаемых контейнерах (например, мешках), что позволяет минимизировать беспокойство фрагмента опухоли и обеспечивать более воспроизводимый рост цитотоксических лимфоцитов. В некоторых вариантах осуществления можно автоматизировать различные части способа, включая в качестве неограничивающих примеров культивирование и/или размножение цитотоксических лимфоцитов. В некоторых вариантах осуществления использование газопроницаемых колб позволяет создавать достаточное число цитотоксических лимфоцитов, что делает возможным лечение субъектов, которых ранее могли не лечить успешно по той причине, что не создавали достаточное число цитотоксических лимфоцитов из-за технических и логистических сложностей предыдущих способов, в которых не используют газопроницаемые колбы.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает культивирование образца ткани опухоли в первом газопроницаемом контейнере, в котором содержится клеточная среда. В одном из вариантов осуществления образец ткани опухоли культивируют непосредственно на газопроницаемом материале в газопроницаемом контейнере без расщепления. В другом варианте осуществления ферментативно или механически расщепленный образец ткани опухоли можно культивировать непосредственно на газопроницаемом материале. Можно использовать любую подходящую клеточную среду. Клеточная культуральная среда дополнительно может содержать любой подходящий Т-клеточный фактор роста, например, такой как интерлейкин (IL)-2. Клеточная культуральная среда необязательно может дополнительно содержать АВ сыворотку человека. В некоторых вариантах осуществления образец ткани опухоли может содержать TIL, которые аутологичны субъекту. В некоторых вариантах осуществления культивирование образца ткани опухоли включает культивирование TIL, присутствующих в образце опухоли.

Способ также включает получение TIL из образца ткани опухоли. Образец ткани опухоли содержит TIL. Поскольку образец ткани опухоли культивируют в газопроницаемом контейнере, например, на газопроницаемом материале в контейнере, TIL, присутствующие в образце ткани опухоли, также начинают

расти в газопроницаемом контейнере, например, на газопроницаемом материале. TIL можно получать из образца ткани опухоли любым подходящим образом.

В некоторых вариантах осуществления первый газопроницаемый контейнер может представлять собой любой подходящий газопроницаемый контейнер. В некоторых вариантах осуществления первый газопроницаемый контейнер содержит основание, бока и крышку. В некоторых вариантах осуществления контейнер содержит газопроницаемую опору и газопроницаемый материал, например, газопроницаемую мембрану. В некоторых вариантах осуществления основание контейнера содержит газопроницаемую опору и газопроницаемый материал, например, газопроницаемую мембрану. В некоторых вариантах осуществления газопроницаемый материал может быть расположен внутри контейнера непосредственно на газопроницаемой опоре, которая содержит отверстия (например, каналы) в соединении по текучей среде с окружающим газом для того, чтобы облегчать газообмен между внутренней частью контейнера и окружающим газом. В некоторых вариантах осуществления крышка может содержать клапан и/или порт (например, порт доступа). В некоторых вариантах осуществления порт доступа может иметь отверстие больше чем приблизительно от 1 мм приблизительно до 1 см (например, больше чем приблизительно 1 мм или больше чем приблизительно 1 см). Порт доступа с отверстием больше чем приблизительно от 1 мм приблизительно до 1 см может благоприятно устранять или уменьшать беспокойство для TIL. В некоторых вариантах осуществления газопроницаемый контейнер содержит клапан или клапанируемый порт, который может быть благоприятным в том случае, если температура в контейнере падает в течение манипуляций. В некоторых вариантах осуществления первый газопроницаемый контейнер представляет собой газопроницаемый контейнер, как описано в публикации патентной заявки США № 2005/0106717, которая включена в настоящее описание посредством ссылки, который коммерчески доступен в Wilson Wolf Manufacturing Corporation (например, контейнеры G-Rex10, GP200, G-Rex100, GP200) (New Brighton, Minn.).

В некоторых вариантах осуществления первый газопроницаемый контейнер имеет любую подходящую объемную емкость для клеточной среды. Например, первый газопроницаемый контейнер может иметь объемную емкость для среды приблизительно 40 мл или больше; приблизительно 200 мл или больше; приблизительно 500 мл или больше; приблизительно 2000 мл или больше; или приблизительно 5000 мл или больше. Несмотря на то, что первый газопроницаемый контейнер может иметь любую подходящую объемную емкость для среды, образец ткани опухоли и/или содержащие TIL цитотоксические лимфоциты можно культивировать в любом подходящем объеме среды. В некоторых вариантах осуществления образец ткани опухоли и/или содержащие TIL цитотоксические лимфоциты культивируют погруженными под слой по меньшей мере приблизительно 1,3 см клеточной культуральной среды. В некоторых вариантах осуществления образец ткани опухоли и/или содержащие TIL цитотоксические лимфоциты культивируют погруженными под слой по меньшей мере приблизительно 2,0 см клеточной культуральной среды. Образцы тканей опухолей и/или TIL, культивируемые на газопроницаемом материале, которые погружены под слой по меньшей мере приблизительно 1,3 см или слой по меньшей мере приблизительно 2,0 см среды, благоприятно можно подвергать манипуляциям и кормить менее часто.

В некоторых вариантах осуществления первый газопроницаемый контейнер может обеспечивать любую подходящую площадь поверхности для роста содержащих TIL цитотоксических лимфоцитов. В некоторых вариантах осуществления газопроницаемый контейнер может иметь площадь поверхности для роста TIL приблизительно 10 см² или больше; приблизительно 100 см² или больше; или приблизительно 650 см² или больше.

В некоторых вариантах осуществления образец ткани опухоли и/или содержащие TIL цитотоксические лимфоциты культивируют внутри первого газопроницаемого контейнера в контакте с газопроницаемым материалом и погруженными под подходящим объемом среды для культивирования. Культивирование образца ткани опухоли и/или TIL в контакте с газопроницаемым материалом облегчает газообмен между клетками и окружающим воздухом. Облегчение газообмена между клетками и окружающим воздухом облегчает дыхание, рост и жизнеспособность клеток. В некоторых вариантах осуществления газообмен через газопроницаемый материал может облегчать циркуляцию среды (например, посредством конвекции и диффузии) внутри контейнера, что облегчает кормление содержащих TIL цитотоксических лимфоцитов. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют до или после культивирования в первом газопроницаемом контейнере. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют с использованием вектора. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; фиг. 11A, фиг. 16A). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; фиг. 11B, фиг. 16B). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе гаммаретровируса. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе pMSCIV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий

19Н9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе рLEV, кодирующий 19Н9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 38А1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 38А1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе рLEV, кодирующий 38А1. В некоторых вариантах осуществления Т1L и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19Н9. В некоторых вариантах осуществления Т1L и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 38А1. В некоторых вариантах осуществления Т1L и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38А1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19Н9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19Н9. В некоторых вариантах осуществления белок 38А1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19Н9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19Н9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19Н9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19Н9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19Н9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19Н9. В некоторых вариантах осуществления белок 38А1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19Н9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38А1. В некоторых вариантах осуществления белок 19Н9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38А1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления тяжелую и легкую цепи кодируют в одном и том же векторе. В некоторых вариантах осуществления тяжелую и легкую цепи кодируют в различных векторах. В некоторых вариантах осуществления тяжелую цепь кодируют в первом векторе. В некоторых вариантах осуществления легкую цепь кодируют во втором векторе. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10

(CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает размножение множества содержащих TIL цитотоксических лимфоцитов во втором газопроницаемом контейнере, в котором содержится клеточная среда, с использованием облученных аллогенных клеток-кормушек и/или облученных аутологических клеток-кормушек. В некоторых вариантах осуществления множество содержащих TIL цитотоксических лимфоцитов размножают с использованием соотношения приблизительно 1 TIL на по меньшей мере приблизительно 20 клеток-кормушек, приблизительно 1 TIL на по меньшей мере приблизительно 25 клеток-кормушек, приблизительно 1 TIL на по меньшей мере приблизительно 50 клеток-кормушек, приблизительно 1 TIL на по меньшей мере приблизительно 100 клеток-кормушек, приблизительно 1 TIL на по меньшей мере приблизительно 200 клеток-кормушек, например, соотношение TIL и клеток-кормушек приблизительно от 1 приблизительно до 20, приблизительно от 1 приблизительно до 25, приблизительно от 1 приблизительно до 50, приблизительно от 1 приблизительно до 100 или приблизительно от 1 приблизительно до 200. В некоторых вариантах осуществления второй газопроницаемый контейнер может представлять собой то, что описано для первого контейнера.

В некоторых вариантах осуществления размножают культивируемые содержащие TIL цитотоксические лимфоциты. В некоторых вариантах осуществления быстро размножают культивируемые содержащие TIL цитотоксические лимфоциты. Быстрое размножение обеспечивает увеличение числа содержащих TIL цитотоксических лимфоцитов по меньшей мере приблизительно в 50 раз (или 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз или более) в течение периода приблизительно от 10 суток приблизительно до 14 суток, и в некоторых вариантах осуществления приблизительно за 14 суток. В некоторых вариантах осуществления быстрое размножение обеспечивает увеличение по меньшей мере приблизительно в 200 раз (или 300 раз, 400 раз, 500 раз, 600 раз, 700 раз, 800 раз, 900 раз или более) в течение периода приблизительно от 10 суток приблизительно до 14 суток, и в некоторых вариантах осуществления приблизительно за 14 суток. В некоторых вариантах осуществления быстрое размножение обеспечивает увеличение по меньшей мере приблизительно в 1000 раз в течение периода приблизительно от 10 приблизительно до 14 суток, в некоторых вариантах осуществления приблизительно 14 суток. В некоторых вариантах осуществления быстрое размножение обеспечивает увеличение в приблизительно от 1000 раз приблизительно до 2000 раз, например приблизительно 1000 раз, приблизительно 1500 раз, или приблизительно 2000 раз, в течение периода приблизительно 14 суток. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют до или после размножения. В некоторых вариантах осу-

шествления цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют с использованием вектора. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; фиг. 11A, фиг. 16A). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; фиг. 11B, фиг. 16B). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе гаммаретровируса. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе pMSCIV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19H9. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 38A1. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления тяжелую и легкую цепи кодируют в одном и том же векторе. В некоторых вариантах осуществления тяжелую и легкую цепи кодируют в различных векторах. В некоторых вариантах осуществления тяжелую цепь кодируют в первом векторе. В некоторых вариантах осуществления легкую цепь кодируют во втором векторе. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и

SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

В некоторых вариантах осуществления размножение (т.е. REP) можно выполнять в газопроницаемом контейнере любым подходящим способом. Например, содержащие TIL цитотоксические лимфоциты можно быстро размножить с использованием неспецифической стимуляции T-клеточных рецепторов в присутствии клеток-кормушек (например, облученных аллогенных клеток-кормушек, облученных аутологичных клеток-кормушек и/или искусственных антигенпредставляющих клеток (например, клеток лейкоза K562, трансдуцированных нуклеиновыми кислотами, кодирующими CD3 и/или CD8)) и интерлейкина-2 (IL-2) или интерлейкина-15 (IL-15), и в некоторых вариантах осуществления IL-2. В некоторых вариантах осуществления при размножении множества содержащих TIL цитотоксических лимфоцитов используют приблизительно от 1×10^9 приблизительно до 4×10^9 аллогенных клеток-кормушек и/или аутологичных клеток-кормушек, предпочтительно приблизительно от 2×10^9 приблизительно до 3×10^9 аллогенных клеток-кормушек и/или аутологичных клеток-кормушек. Неспецифический стимул T-клеточных рецепторов может включать, например, приблизительно 30 нг/мл ОКТ3, моноклонального антитела мыши против CD3 (доступно в ORTHO-MCNEIL, Raritan, N.J. или MILTENYI BIOTECH, Auburn, Calif.). Альтернативно, содержащие TIL цитотоксические лимфоциты можно быстро размножить посредством, например, стимуляции содержащих TIL цитотоксических лимфоцитов *in vitro* с использованием антигена (одного или более, в том числе их антигенных частей, таких как эпитоп(ы), или клетки злокачественной опухоли, который можно необязательно экспрессировать из вектора, такой как связывающий лейкоцитарный антиген человека A2 (HLA-A2) пептид, например, 0,3 мкМ MART-1:26-35 (27L)

или gp100:209-217 (210M), в присутствии Т-клеточного фактора роста, такого как 300 МЕ/мл IL-2 или IL-15, и в некоторых вариантах осуществления IL-2. Другие подходящие антигены могут включать, например, NY-ESO-1, TRP-1, TRP-2, злокачественный опухолевый антиген тирозиназы, MAGE-A3, SSX-2 и VEGFR2 или их антигенные части. Индуцируемые *in vitro* TIL быстро размножают посредством повторной стимуляции тем же антигеном(ми) злокачественной опухолью, импульсно подаваемыми на HLA-A2-экспрессирующие антигенпредставляющие клетки.

Альтернативно TIL можно повторно стимулировать, например, с использованием облученных аутологических лимфоцитов или, например, облученных HLA-A2+ аллогенных лимфоцитов и IL-2.

В некоторых вариантах осуществления размножение множества TIL может включать использование приблизительно от 5000 мл приблизительно до 10000 мл клеточной среды, предпочтительно приблизительно от 5800 мл приблизительно до 8700 мл клеточной среды. В одном из вариантов осуществления при размножении множества TIL используют клеточную культуральную среду не больше чем одного типа. Можно использовать любую подходящую клеточную культуральную среду, например, клеточную среду AIM-V (L-глутамин, 50 мкг/мл стрептомицина сульфата и 10 мкг/мл гентамицина сульфата) клеточную культуральную среду (Invitrogen, Carlsbad Calif.). В связи с этим патентоспособные способы благоприятно снижают количество среды и число типов сред, необходимых для размножения множества содержащих TIL цитотоксических лимфоцитов.

В некоторых вариантах осуществления размножение числа содержащих TIL цитотоксических лимфоцитов может включать кормление клеток не более часто, чем каждые третьи или четвертые сутки. Размножение множества клеток в газопроницаемом контейнере благоприятно упрощает процедуры, необходимые для размножения множества клеток, уменьшая частоту кормления, необходимую для размножения клеток.

В некоторых вариантах осуществления клеточная среда в первом и/или втором газопроницаемом контейнере является нефильтрованной. Без ограничения конкретной теорией полагают, что частицы компонентов сыворотки, присутствующие в некоторых добавках для клеточных сред (например, АВ сыворотка) оказывают небольшие или нулевые вредоносные эффекты на рост TIL. Использование нефильтрованной клеточной среды может благоприятно упрощать процедуры, необходимые для размножения множества клеток.

В некоторых вариантах осуществления клеточная среда в первом и/или втором газопроницаемом контейнере не содержит β-меркаптоэтанол (BME). В некоторых вариантах осуществления отсутствие BME в клеточной среде может благоприятно больше соответствовать cGMP (существующим надлежащим процедурам производства) и, таким образом, может благоприятно упрощать получение одобрения регулирующего органа.

В некоторых вариантах осуществления длительность способа, включающего получение образца ткани опухоли у млекопитающего; культивирование (т.е. предварительное REP) образца ткани опухоли в первом газопроницаемом контейнере, в котором содержится клеточная среда; получение содержащих TIL цитотоксических лимфоцитов из образца ткани опухоли; размножение (т.е. REP) множества содержащих TIL цитотоксических лимфоцитов во втором газопроницаемом контейнере, в котором содержится клеточная среда, с использованием облученных аллогенных клеток-кормушек и/или облученных аутологических клеток-кормушек, может составлять приблизительно от 28 приблизительно до 42 суток, например, приблизительно 28 суток. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют до или после культивирования, до или после получения TIL-содержащих цитотоксических лимфоцитов или до или после размножения. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют с использованием вектора. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; фиг. 11A, фиг. 16A). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; фиг. 11B, 16B). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе гаммаретровируса. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе pMSCIV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19H9. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 38A1. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретиро-

вать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличения увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления тяжелую и легкую цепи кодируют в одном и том же векторе. В некоторых вариантах осуществления тяжелую и легкую цепи кодируют в различных векторах. В некоторых вариантах осуществления тяжелую цепь кодируют в первом векторе. В некоторых вариантах осуществления легкую цепь кодируют во втором векторе. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv

(scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение размноженных содержащих TIL цитотоксических лимфоцитов млекопитающему. Содержащие TIL цитотоксические лимфоциты можно вводить через любой подходящий путь, как известно в данной области. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты вводят в виде внутриартериальной или внутривенной инфузии, которая предпочтительно длится приблизительно от 30 приблизительно до 60 мин. Другие примеры путей введения включают интраперитонеальный, интратекальный и внутрелимфатический. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют перед введением. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют с использованием вектора. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; фиг. 11A, 16A). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; фиг. 11B, 16B). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе гаммаретровируса. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе pMSCIV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19H9. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 38A1. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 по-

ложительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления тяжелую и легкую цепи кодируют в одном и том же векторе. В некоторых вариантах осуществления тяжелую и легкую цепи кодируют в различных векторах. В некоторых вариантах осуществления тяжелую цепь кодируют в первом векторе. В некоторых вариантах осуществления легкую цепь кодируют во втором векторе. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98%

идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

В дополнение к TIL, цитотоксические лимфоциты, макрофаги, моноциты и естественные киллерные (NK) клетки также можно получать из образца ткани опухоли, культивировать и размножать, как раскрыто в настоящем описании для TIL. Соответственно, способ также может включать введение макрофагов, моноцитов и естественных киллерных (NK) клеток млекопитающему. В некоторых вариантах осуществления способы можно использовать для размножения цитотоксических лимфоцитов.

В некоторых вариантах осуществления T-клеточный фактор роста, который способствует росту и активации TIL и/или цитотоксических лимфоцитов, вводят млекопитающему или параллельно с TIL или после TIL. T-клеточный фактор роста может представлять собой любой подходящий фактор роста, который способствует росту и активации TIL. Примеры подходящих T-клеточных факторов роста включают интерлейкин (IL)-2, IL-7, IL-15 и IL-12, которые можно использовать отдельно или в различных комбинациях, таких как IL-2 и IL-7, IL-2 и IL-15, IL-7 и IL-15, IL-2, IL-7 и IL-15, IL-12 и IL-7, IL-12 и IL-15 или IL-12 и IL-2. IL-2 является предпочтительным T-клеточным фактором роста.

В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты модифицируют для того, чтобы экспрессировать T-клеточный фактор роста, который способствует росту и активации TIL и/или цитотоксических лимфоцитов. Подходящие T-клеточные факторы роста включают, например, любые из тех, что описаны выше. Подходящие способы модификации известны в данной области. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3-е изд., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001; и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994. В некоторых вариантах осуществления модифицированные TIL и/или цитотоксические лимфоциты экспрессируют T-клеточный фактор роста на высоких уровнях. Кодированные T-клеточный фактор роста последовательности, например, таковые для IL-12, легко доступны в данной области, как промоторы, функциональная связь которых с кодирующей T-клеточный фактор роста последовательностью способствуют экспрессии на высоком уровне. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты можно модифицировать для того, чтобы экспрессировать IL-12, как описано в публикации патентной заявки World Intellectual Property Organization № WO 2010/126766, которая включена в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления два цитокина могут быть более эффективными, чем один цитокин, и в некоторых вариантах осуществления три цитокина, например, IL-2, IL-7 и IL-15, могут быть более эффективными, чем любые два цитокина. Полагают, что IL-15 усиливает опухолеспецифический ответ CD8⁺ T-клеток. В связи с этим, введение IL-15-культивируемых клеток с IL-2 (такое как болюсная инъекция) может быть особенно эффективным. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты, модифицированные для того, чтобы экспрессировать IL-15, можно вводить с IL-2 в виде болюсной инъекции.

T-клеточный фактор роста можно вводить через любой подходящий путь. В вариантах осуществления, где вводят больше чем один T-клеточный фактор роста, их можно вводить одновременно или последовательно, в любом порядке, и через один и тот же путь или различные пути. В некоторых вариантах осуществления T-клеточный фактор роста, такой как IL-2, вводят внутривенно в виде болюсной инъекции. В некоторых вариантах осуществления доза T-клеточного фактора роста, такого как IL-2, представляет собой то, что средние специалисты в данной области считают высоким. В некоторых вариантах осуществления дозу IL-2 приблизительно 720000 МЕ/кг вводят три раза в сутки до толерантности, в частности когда злокачественная опухоль представляет собой меланому. В некоторых вариантах осуществления вводят приблизительно от 5 приблизительно до 15 доз IL-2, усредненно приблизительно 8 доз.

TIL и/или цитотоксические лимфоциты могут распознавать любые уникальные антигены, продуцируемые в результате оценочно 10000 генетических мутаций, кодируемых геномом каждой опухолевой клетки. Однако антиген не обязан быть уникальным. TIL и/или цитотоксические лимфоциты могут распознавать один или более антигенов злокачественной опухоли, в том числе антигенную часть одного или более антигенов, такую как эпитоп, или клетку злокачественной опухоли. "Антиген злокачественной опухоли" предназначен для того, чтобы охватывать все указанные выше антигены. Если злокачественная опухоль представляет собой меланому, такую как метастатическая меланома, TIL и/или цитотоксические лимфоциты могут распознавать MART-1 (например, MART-1:26-35 (27L)), gp100 (например, gp100:209-

217 (210M)) или "уникальный" или специфический антиген пациента, полученный из мутации, кодируемой опухолью. Другие подходящие антигены меланомы, которые могут распознавать TIL, могут включать, но не ограничиваясь этим, тирозиназу, связанный с тирозиназой белок (TRP)1, TRP2 и MAGE. TIL также могут распознавать антигены, например, такие как NY-ESO-1, теломераза, p53, HER2/neu, эмбриональный опухолевый антиген или специфический антиген предстательной железы, для лечения карциномы легкого, злокачественной опухоли молочной железы, злокачественной опухоли ободочной кишки, злокачественной опухоли предстательной железы и т.п.

В некоторых вариантах осуществления предусмотренный способ представляет собой способ получения размноженного множества TIL и/или цитотоксических лимфоцитов у млекопитающего для адоптивной клеточной иммунотерапии, который включает получение образца ткани опухоли у млекопитающего; культивирование образца ткани опухоли в первом газопроницаемом контейнере, в котором содержится клеточная среда; получение TIL и/или цитотоксических лимфоцитов из образца ткани опухоли; размножение множества TIL и/или цитотоксических лимфоцитов во втором газопроницаемом контейнере, в котором содержится клеточная среда, с использованием облученных аллогенных клеток-кормушек и/или облученных аутологичных клеток-кормушек. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты представляют собой генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют с использованием вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; фиг. 11A, фиг. 16A). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; фиг. 11B, 16B). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе гаммаретровируса. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе рMSCIV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19H9. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 38A1. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет

более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют после получения образца ткани опухоли у млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют до или после культивирова-

ния (т.е. предварительного REP) образца ткани опухоли в первом газопроницаемом контейнере, в котором содержится клеточная среда. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют после получения TIL и/или цитотоксических лимфоцитов из образца ткани опухоли. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют после размножения (т.е. REP) множества TIL и/или цитотоксических лимфоцитов во втором газопроницаемом контейнере, в котором содержится клеточная среда, с использованием облученных аллогенных клеток-кормушек и/или облученных аутологичных клеток-кормушек. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты представляют собой генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют с использованием вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; фиг. 11A, 16A). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; фиг. 11B, 16B). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе гаммаретровируса. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе rMSCIV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19H9. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 38A1. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с

SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

В некоторых вариантах осуществления способ включает получение образца ткани опухоли у млекопитающего. Образец ткани опухоли можно получать, как раскрыто в настоящем описании в отношении любых вариантов осуществления изобретения.

В некоторых вариантах осуществления способ включает культивирование образца ткани опухоли в первом газопроницаемом контейнере, в котором содержится клеточная среда. Образец ткани опухоли можно культивировать в первом газопроницаемом контейнере, как раскрыто в настоящем описании в отношении любых вариантов осуществления изобретения.

В некоторых вариантах осуществления способ включает получение содержащих TIL цитотоксических лимфоцитов из образца ткани опухоли. Содержащие TIL цитотоксические лимфоциты можно получать из образца ткани опухоли, как раскрыто в настоящем описании в отношении любых вариантов осуществления изобретения.

В некоторых вариантах осуществления способ включает размножение множества TIL и/или цитотоксических лимфоцитов во втором газопроницаемом контейнере, в котором содержится клеточная среда, с использованием облученных аллогенных клеток-кормушек и/или облученных аутологичных кле-

ток-кормушек. Множество ТП и/или цитотоксических лимфоцитов можно размножить, как раскрыто в настоящем описании в отношении любых вариантов осуществления изобретения.

В некоторых вариантах осуществления способ включает получение размноженного множества ТП и/или цитотоксических лимфоцитов от млекопитающего для адоптивной клеточной иммунотерапии, где способ включает получение образца ткани опухоли у млекопитающего; получение содержащих ТП цитотоксических лимфоцитов из образца ткани опухоли; размножение множества ТП и/или цитотоксических лимфоцитов в газопроницаемом контейнере, в котором содержится клеточная среда, с использованием облученных аллогенных клеток-кормушек и/или облученных аутологичных клеток-кормушек. В некоторых вариантах осуществления газопроницаемый контейнер представляет собой первый газопроницаемый контейнер. Получение образца ткани опухоли у млекопитающего, получение ТП и/или цитотоксических лимфоцитов из образца ткани опухоли и размножение множества ТП и/или цитотоксических лимфоцитов во втором газопроницаемом контейнере, в котором содержится клеточная среда, с использованием облученных аллогенных клеток-кормушек и/или облученных аутологичных клеток-кормушек можно осуществлять, как раскрыто в настоящем описании в отношении любых вариантов осуществления изобретения. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты представляют собой генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления ТП и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют с использованием вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; фиг. 11A, 16A). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; фиг. 11B, 16B). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе гаммаретровируса. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе rMSCIV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления ТП и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19H9. В некоторых вариантах осуществления ТП и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 38A1. В некоторых вариантах осуществления ТП и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах

осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

В некоторых вариантах осуществления предоставленный способ представляет собой способ содействия регрессии злокачественной опухоли у млекопитающего, который включает получение образца ткани опухоли; размножение множества TIL и/или цитотоксических лимфоцитов из образца ткани опухоли; размножение множества TIL и/или цитотоксических лимфоцитов в первом газопроницаемом контейнере и втором газопроницаемом контейнере, в которых содержится клеточная среда, с

использованием облученных аллогенных клеток-кормушек и/или облученных аутологичных клеток-кормушек; и введение размноженного множества TIL и/или цитотоксических лимфоцитов млекопитающему. В некоторых вариантах осуществления получение образца ткани опухоли у млекопитающего, получение TIL из образца ткани опухоли, размножение множества TIL и/или цитотоксических лимфоцитов в газопроницаемом контейнере, в котором содержится клеточная среда, с использованием облученных аллогенных клеток-кормушек и/или облученных аутологичных клеток-кормушек и введение размноженного множества TIL и/или цитотоксических лимфоцитов млекопитающему можно осуществлять, как раскрыто в настоящем описании в отношении любых вариантов осуществления, описанных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает отбор TIL и/или цитотоксических лимфоцитов, способных лизировать клетки злокачественной опухоли. TIL и/или цитотоксические лимфоциты можно отбирать, как раскрыто в настоящем описании в отношении любых вариантов осуществления изобретения. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты представляют собой генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют с использованием вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; фиг. 11A, фиг. 16A). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; фиг. 11B, фиг. 16B). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе гаммаретровируса. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе pMSCIV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19H9. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 38A1. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи

сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют после получения образца ткани опухоли у млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют до или после выделения содержащих TIL цитотоксических лимфоцитов из образца ткани опухоли. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют до или после размножения множества TIL и/или цитотоксических лимфоцитов во втором газопроницаемом контейнере, в котором

содержится клеточная среда, с использованием облученных аллогенных клеток-кормушек и/или облученных аутологичных клеток-кормушек. В некоторых вариантах осуществления ТИЛ и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют перед введением размноженного множества ТИЛ и/или цитотоксических лимфоцитов млекопитающему.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты не тестируют на специфическую опухолевую реакционную способность для того, чтобы идентифицировать опухолереактивные цитотоксические лимфоциты, перед введением пациенту.

Специфическую опухолевую реакционную способность можно тестировать любым известным в данной области способом, например, посредством измерения высвобождения цитокинов (например, интерферона- γ) после совместного культивирования с опухолевыми клетками. Патентоспособные способы благоприятно позволяют содействовать регрессии злокачественной опухоли у млекопитающего посредством введения цитотоксических лимфоцитов млекопитающему без необходимости предшествующего скрининга по специфическому распознаванию опухоли. Варианты осуществления способов, при желании, могут включать тестирование цитотоксических лимфоцитов на активность не антигенспецифическим образом перед введением цитотоксических лимфоцитов млекопитающему. В некоторых вариантах осуществления активность цитотоксических лимфоцитов можно необязательно тестировать, например, посредством анализа неспецифической активности, измеряя высвобождение цитокинов после ОКТЗ стимуляции. Т-клетки можно считать активными, например, если высвобождение интерферона (IFN) составляет больше чем приблизительно 50 пг/мл, больше чем приблизительно 100 пг/мл, больше чем приблизительно 150 пг/мл или больше чем приблизительно 200 пг/мл. Менее желаемый вариант осуществления способа включает тестирование размноженных цитотоксических лимфоцитов на специфическую опухолевую реакционную способность для того, чтобы идентифицировать опухолереактивные цитотоксические лимфоциты.

Дополнительные способы культивирования ТИЛ и/или цитотоксических лимфоцитов

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно может включать культивирование ткани опухоли любым подходящим способом, который облегчает получение ТИЛ и/или цитотоксических лимфоцитов из образца ткани опухоли. В связи с этим, культивирование ткани опухоли может включать создание нескольких независимых культур, например, микрокультур. Например, культивирование ткани опухоли может включать культивирование фрагментов опухоли в планшетах, например, 2 4-луночных планшетах. В некоторых вариантах осуществления ткани опухоли культивируют без газопроницаемого контейнера.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает отбор ТИЛ и/или цитотоксических лимфоцитов, способных лизировать клетки злокачественной опухоли, тогда как в других вариантах осуществления способ не включает отбор ТИЛ, способных лизировать клетки злокачественной опухоли. ТИЛ, способные лизировать клетки злокачественной опухоли, можно отбирать посредством идентификации ТИЛ, имеющих любой подходящий признак, связанный с лизисом клеток злокачественной опухоли и/или регрессией злокачественной опухоли. Образцовые подходящие признаки ТИЛ, которые могут служить в качестве основания для отбора ТИЛ, могут включать любое одно или более из высвобождения IFN- γ при совместном культивировании с аутологичными опухолевыми клетками; экспрессию одного или более из CD8, CD27 и CD28 на клеточной поверхности; и длину теломеров. Без ограничения конкретной теорией полагают, что экспрессия одного или более из CD8, CD27 и CD28 на клеточной поверхности и более длинные теломеры связаны с положительными объективными клиническими ответами у пациентов и персистенцией клеток *in vivo*. Предпочтительно признаком является высвобождение IFN- γ при совместном культивировании с аутологичными опухолевыми клетками. В одном из вариантов осуществления изобретения отобранные ТИЛ высвобождают IFN- γ приблизительно 200 пг/мл или больше при совместном культивировании с опухолевыми клетками.

В некоторых вариантах осуществления отбор ТИЛ, способных лизировать клетки злокачественной опухоли, включает тестирование индивидуальных культур на присутствие признака и идентификацию ТИЛ, обладающих признаком. Способы тестирования культур на присутствие любого одного или более из высвобождения IFN- γ при совместном культивировании с аутологичными опухолевыми клетками; экспрессии одного или более из CD8, CD27 и CD28 на клеточной поверхности; и длины теломеров (более длинные теломеры связаны с регрессией злокачественной опухоли) известны в данной области.

В некоторых вариантах осуществления можно отбирать любое число культур. Например, можно отбирать одну, две, три, четыре, пять или больше культур. В вариантах осуществления, в которых отбирают две или больше культур, можно комбинировать отобранные культуры и размножать множество ТИЛ в одном (или больше) газопроницаемом контейнере. В вариантах осуществления, в которых отбирают две или больше культур, каждую отобранную культуру размножают отдельно в отдельных контейнерах, в том числе газопроницаемых контейнерах, когда используют такие контейнеры.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно может включать размножение множества ТИЛ и/или цитотоксических лимфоцитов в идентифицированной культуре во втором газопроницаемом контейнере, в котором содержится клеточная среда, с использованием облученных аллогенных

клеток-кормушек и/или облученных аутологичных клеток-кормушек, как раскрыто в настоящем описании в отношении любых вариантов осуществления изобретения. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты, которые размножают во втором газопроницаемом контейнере, представляют собой генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют с использованием вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; фиг. 11A, 16A). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; фиг. 11B, 16B). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе гаммаретровируса. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе rMSCIV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19H9. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 38A1. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осу-

шествования связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

Введение популяции генетически модифицированных цитотоксических лимфоцитов

После размножения до подходящего числа, популяцию генетически модифицированных цитотоксических лимфоцитов можно вводить, например, вливать, субъекту с использованием любого подходящего способа и/или устройства, известного в данной области. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют с использованием вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; фиг. 11A, 16A). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; фиг. 11B, 16B). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе гаммаретровируса. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе rMSCIV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 19H9. В некоторых

вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19H9. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 38A1. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последователь-

ность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

Композиции по настоящему раскрытию, например генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты по настоящему раскрытию, можно вводить или отдельно, или в виде фармацевтической композиции в комбинации с разбавителями и/или с другими компонентами, такими как IL-2 или другие цитокины или популяции клеток. В кратком изложении, фармацевтические композиции по настоящему раскрытию могут содержать популяцию генетически модифицированных цитотоксических лимфоцитов, как раскрыто в настоящем описании, например, в связи с любым вариантом осуществления, описанным в настоящем описании, в комбинации с одним или более фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или эксципиентами. Такие композиции могут содержать буферы, такие как нейтральный буферный солевой раствор, фосфатно-солевой буфер и т.п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие средства, такие как EDTA или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия); и консерванты. Композиции по настоящему изобретению предпочтительно формулируют для внутривенного введения или инъекции в месте опухоли.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить таким образом, который подходит для заболевания, подлежащего лечению (или предотвращению).

Количество и частоту введения следует определять с помощью таких факторов как состояние пациента и тип и тяжесть заболевания пациента, хотя подходящие дозы можно определять посредством клинических исследований.

Когда указывают "противоопухолевое эффективное количество", "ингибирующее опухоль эффективное количество" или "терапевтическое количество", точное количество композиций по настоящему изобретению, подлежащих введению, может определять врач с учетом индивидуальных различий в возрасте, массе, размере опухоли, степени инфекции или метастазов и состояния пациента (субъекта). В целом можно отметить, что фармацевтическую композицию, содержащую генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты, описанные в настоящем описании, можно вводить в дозе от 10^4 до 10^{11} клеток/кг массы тела (например, от 10^5 до 10^6 , от 10^5 до 10^{10} , от 10^5 до 10^{11} , от 10^6 до 10^{10} , от 10^6 до 10^{11} , от 10^7 до 10^{11} , от 10^7 до 10^{10} , от 10^8 до 10^{11} , от 10^8 до 10^{10} , от 10^9 до 10^{11} или от 10^9 до 10^{10} клеток/кг массы тела), включая все целые значения в пределах этих диапазонов. Композиции генетически модифицированных цитотоксических лимфоцитов также можно вводить несколько раз в этих дозах. Генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты можно вводить с использованием приемов инфузии, которые общеизвестны в иммунотерапии (см., например, Rosenberg et al., *New Eng. J. of Med.* 319: 1676, 1988). Оптимальную дозу и схему лечения для конкретного пациента может легко определять специалист в области медицины, осуществляя у пациента мониторинг признаков заболевания и корректируя лечение соответствующим образом.

Введение рассматриваемых композиций можно осуществлять любым удобным образом, в том чис-

ле посредством аэрозольной ингаляции, инъекции, глотания, трансфузии, имплантации или трансплантации. Композиции, описанные в настоящем описании, можно вводить пациенту системно или локально (например, в месте опухоли). Композиции, описанные в настоящем описании можно вводить пациенту подкожно, внутрикожно, внутрь опухоли, внутрь узла, интрамедуллярно, внутримышечно, посредством внутривенной (i.v.) инъекции или интраперитонеально. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему раскрытию вводят пациенту посредством внутрикожной или подкожной инъекции. В некоторых случаях композиции по настоящему раскрытию вводят посредством i.v. инъекции. Композиции по настоящему раскрытию можно инъектировать непосредственно в опухоль, лимфатический узел или место инфекции.

В некоторых вариантах осуществления размноженные содержащие Т1L цитотоксические лимфоциты, цитотоксические лимфоциты и/или генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты, полученные с помощью раскрытых способов, вводят в виде внутриартериальной или внутривенной инфузии. В некоторых вариантах осуществления введение длится приблизительно от 30 приблизительно до 60 мин. В некоторых вариантах осуществления пути введения включают интраперитонеальный, интратекальный и внутрелимфатический. В некоторых вариантах осуществления Т1L и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют после получения образца ткани опухоли у млекопитающего, в любое время в течение размножения, но перед введением млекопитающему. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты представляют собой генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления Т1L и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют с использованием вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; фиг. 11A, 16A). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; фиг. 11B, 16B). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе гаммаретровируса. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе рMSCIV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления Т1L и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19H9. В некоторых вариантах осуществления Т1L и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 38A1. В некоторых вариантах осуществления Т1L и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увели-

ченную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

Лимфоистошающие способы

В некоторых вариантах осуществления не миелоаблятивную лимфоистошающую химиотерапию

вводят млекопитающему перед введением млекопитающему размноженных цитотоксических лимфоцитов, полученных из инфильтрирующей опухоль лимфоцитов. Цель лимфоистощения состоит в том, чтобы создать простор для влитых лимфоцитов, в частности, посредством элиминации регуляторных Т-клеток и других неспецифических Т-клеток, которые конкурируют за гомеостатические цитокины. Не миелоаблятивная лимфоистошающая химиотерапия может представлять собой любую такую подходящую терапию, которую можно вводить через любой подходящий путь, известный специалисту. Не миелоаблятивная лимфоистошающая химиотерапия может включать, например, введение циклофосфида и флударабина, в частности, если злокачественной опухолью является меланома, которая может быть метастатической. В некоторых вариантах осуществления путь введения циклофосфида и флударабина является внутривенным. Аналогичным образом, можно вводить любую подходящую дозу циклофосфида и флударабина. Предпочтительно, приблизительно 40-80 мг/кг, например, приблизительно 60 мг/кг, циклофосфида вводят в течение приблизительно двух суток, после чего вводят приблизительно 15-35 мг/м², например, приблизительно 25 мг/м², флударабина в течение приблизительно пяти суток, в частности, если злокачественная опухоль представляет собой меланому.

В некоторых вариантах осуществления не миелоаблятивную лимфоистошающую химиотерапию вводят млекопитающему перед введением млекопитающему цитотоксических лимфоцитов, которые генетически модифицируют. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют с использованием вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; фиг. 11A, фиг. 16A). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; фиг. 11B, 16B). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе гаммаретровируса. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе pMSCIV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19H9. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 38A1. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функ-

цию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

Комбинированная терапия

В некоторых вариантах осуществления подходящая терапия включает экспонирование субъекта одной или более мерам лимфоистощения перед введением генетически модифицированных цитотоксических лимфоцитов по настоящему раскрытию. Меры лимфоистощения могут принимать форму химео-

или лучевой терапии. Подходящие химиотерапевтические меры могут включать, например, лечение циклофосфамидом и/или флударабином.

В некоторых вариантах осуществления по настоящему раскрытию клетки, размноженные с использованием способов, описанных в настоящем описании, например, в связи с любым вариантом осуществления, описанным в настоящем описании, или других известных в данной области способов, где лимфоциты размножают до терапевтических уровней, вводят пациенту в сочетании с (например, до, одновременно или после) любым числом релевантных терапевтических модальностей, включая в качестве неограничивающих примеров лечение средствами, такими как противовирусная терапия, лечение цидофовиром и интерлейкином-2, цитарабином (также известный как ARA-C) или натализумабом для MS пациентов или лечение эфализумабом для пациентов с псориазом или другое лечение для PML пациентов. В дополнительных вариантах осуществления генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты по изобретению можно использовать в комбинации с химиотерапией, излучением, иммуносупрессорными средствами, такими как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, микофенолат и FK506, антитела или другие иммуноаблятивные средства, такие как CAMPATH, антитела против CD3, или терапией другими антителами, цитокином, флударибином, циклоспорином, FK506, рапамицином, микофеноловой кислотой, стероидами, FR901228, цитокинами и облучением. Эти лекарственные средства ингибируют или кальций-зависимую фосфатазу кальциневрин (циклоспорин и FK506) или ингибируют киназу p70S6, которая важна для индуцированной факторами роста передачи сигналов (рапамицин) (Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993). В дополнительном варианте осуществления клеточные композиции по настоящему раскрытию вводят пациенту в сочетании с (например, до, одновременно или после) трансплантацией костного мозга, Т-клеточной аблятивной терапией с использованием химиотерапевтических средств, таких как, флударабин, лучевой терапии внешним пучком (XRT), циклофосфамида или антител, таких как OKT3 или CAMPATH. В другом варианте осуществления клеточные композиции по настоящему раскрытию вводят после В-клеточной аблятивной терапии, например, средства, которые реагируют с CD20, например, ритуксан. Например, в одном из вариантов осуществления субъекты могут проходить стандартное лечение химиотерапией в высокой дозе, после чего следует трансплантация стволовых клеток периферической крови. В определенных вариантах осуществления после трансплантации, субъекты получают инфузию размноженных генетически модифицированных цитотоксических лимфоцитов по настоящему раскрытию. В дополнительном варианте осуществления размноженные клетки вводят до или после хирургического вмешательства.

В некоторых вариантах осуществления генетически модифицируют размноженные клетки, вводимые до или после хирургического вмешательства. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют с использованием вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; фиг. 11A, 16A). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; фиг. 11B, 16B). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе гаммаретровируса. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе pMSCIV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19H9. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 38A1. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной ци-

тометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% иден-

тичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты вводят одновременно со стандартным лекарственным средством или терапией против злокачественной опухоли. Многие лекарственные средства и терапии против злокачественных опухолей доступны для комбинирования с данными способами и композициями. Далее приведены не исчерпывающие списки лекарственных средств против злокачественных опухолей (против новообразований), которые можно использовать в сочетании с облучением: ацивирин; акларубин; акодозола гидрохлорид; AcrQnine; адозелезин; альдеслейкин; алтретамин; амбомицин; аметантрона ацетат; аминоклоротетимид; амсакрин; анастрозол; антрамицин; аспарагиназа; асперлин; азациитидин; азетеп; азотомидин; батимастат; бензодепа; бикалутамид; бисантрена гидрохлорид; биснафида димезилат; бизелезин; блеомицина сульфат; бреквинар натрия; бропиримин; бусульфан; кактиномицин; калустерон; карацемид; карбетимер; карбоплатин; кармустин; карубицина гидрохлорид; карзелезин; кадефингол; хлорамбуцил; циролемицин; цисплатин; кладрибин; криснатола мезилат; циклофосфамид; цитарабин; дакарбазин; дактиномицин; даунорубицина гидрохлорид; децитабин; дексормаплатин; дезагуанин; дезагуанина мезилат; диазиквон; доцетаксел; доксорубин; доксорубицина гидрохлорид; дролоксифен; дролоксифена цитрат; дромостанолон пропионат; дуазомицин; эдатрексат; эфломитина гидрохлорид; элсамитруцин; энлоплатин; энпромаг; эпипропидин; эпирубицина гидрохлорид; эрбулозол; эзорубицина гидрохлорид; эстрамустин; эстрамустинфосфат натрия; этанидазол; этиодизированное масло 1131; этопозид; этопозид фосфат; этоприн; фадрозол гидрохлорид; фазарабин; фенретинид; флоксуридин; флударабин фосфат; фторурацил; флуороцитабин; фосквидон; фостриecin натрия; гемцитабин; гемцитабин гидрохлорид; золото Au 198; гидроксимочевина; идарубицина гидрохлорид; ифосфамид; илмофосин; ипроплатин; иринотекана гидрохлорид; ланреотида ацетат; летрозол; лейпролида ацетат; лиарозола гидрохлорид; лометрексол натрия; ломустин; лозоксантрона гидрохлорид; масопрокол; майтанзин; мехлорэтамид гидрохлорид; мегестрола ацетат; меленгестрола ацетат; мелфалан; меногарил; меркаптопурин; метотрексат; метотрексат натрия; метоприн; метуредеп; митиндомид; митокарцин; митокромин; митогиллин; митомалцин; митомидин; митоспер; митотан; митоксантрона гидрохлорид; микофеноловая кислота; нокадазол; ногаламицин; ормаплатин; оксисуран; паклитаксел; пегаспаргаза; пелиомицин; пентамустин; пепломицина сульфат; перфосфамид; пипоброман; пипосульфат; пироксантрона гидрохлорид; пликамицин; пломестан; порфирин натрия; порфирамицин; преднимустин; прокарбазина гидрохлорид; пурамицин; пурамицина гидрохлорид; пиразофурин; рибоприн; роглетимид; сафмгол; сафингола гидрохлорид; семустин; симтразен; спарфосат натрия; спарсомицин; спирогермания гидрохлорид; спиромустин; спироплатин; стрептонигрин; стрептозоцин; стронция хлорид Sr 89; сулофенур; талисомицин; таксан; таксоид; текогалан натрия; тегафур; телоксантрона гидрохлорид; темопорфин; тенипозид; тероксирон; тестолактон; тиамиприн; тиогуанин; тиотепа; тиазофурин; тирапазамин; топотекана гидрохлорид; торемифена цитрат; трестолон ацетат; трицирибина фосфат; триметрексат; триметрексата глюкуролат; трипторелин; тубулозола гидрохлорид; урамустин; уредеп; вапреотид; вертепорфин; винбластин сульфат; винкристина сульфат; виндезин; виндезина сульфат; винепидина сульфат; винглицината сульфат; винлеурозина сульфат; винорелбина тартрат; винрозидина сульфат; винзолидина сульфат; ворозол; зениплатин; зиностатин; зорубицина гидрохлорид.

Субъекты, подходящие для лечения

Субъекты, подходящие для лечения с использованием раскрытых способов и композиций, включают, но не ограничиваясь этим, тех которые имеют (например, диагностированы в качестве имеющих) или имеют риск иметь злокачественную опухоль и/или хроническую вирусную инфекцию. Типы злокачественных опухолей, которые могут поддаваться лечению с использованием способов и композиций, раскрытых в настоящем описании, включают, но не ограничиваясь этим, метастатическую меланому, лимфому, лейкоз и солидные опухоли, происходящие из поджелудочной железы или головного мозга. Типы хронических вирусных инфекций, которые могут поддаваться лечению с использованием способов и композиций, раскрытых в настоящем описании, включают, но не ограничиваясь этим, посттрансплантационные лимфопролиферативные заболевания (PTLD), связанные с инфекцией вируса Эпштейна-Барр (EBV), инфекцией папилломавируса человека (HPV), цитомегаловируса и аденовируса. Субъекты, инфицированные вирусами гепатита С и В, также могут поддаваться лечению с использованием способов и композиций, раскрытых в настоящем описании.

Злокачественные опухоли, которые можно лечить, включают опухоли, которые не васкуляризованы или еще по существу не васкуляризованы, а также васкуляризованные опухоли. Злокачественные опухоли могут содержать не солидные опухоли (такие как гематологические опухоли, например, лейкозы и лимфомы) или могут содержать солидные опухоли. Типы злокачественных опухолей, подлежащих лечению с использованием способов и композиций по настоящему раскрытию включают, но не ограничиваясь этим, карциному, бластому и саркому, и определенные лейкозные или лимфоидные злокачественные новообразования, доброкачественные и злокачественные опухоли и злокачественные новообразования, например, саркомы, карциномы и меланомы. Опухоли/злокачественные опухоли взрослых и опухоли/злокачественные опухоли детей также включены.

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

Солидные опухоли представляют собой аномальные массы ткани, которые обычно не содержат кисты или жидкие области. Солидные опухоли могут быть доброкачественными или озлокачествленными. Солидные опухоли различных типов называют по типу клеток, которые их образуют (например, саркомы, карциномы и лимфомы). Примеры солидных опухолей, таких как саркомы и карциномы, включают фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеосаркому и другие саркомы, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, карциному ободочной кишки, лимфоидное злокачественное новообразование, злокачественную опухоль поджелудочной железы, злокачественную опухоль молочной железы, злокачественную опухоль легких, злокачественную опухоль яичников, злокачественную опухоль предстательной железы, гепатоцеллюлярную карциному, плоскоклеточную карциному, базальноклеточную карциному, аденокарциному, карциному потовой железы, медуллярную карциному щитовидной железы, папиллярную карциному щитовидной железы, феохромоцитому, карциному сальной железы, папиллярную карциному, папиллярные аденокарциномы, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, почечноклеточную карциному, гепатому, карциному желчного протока, хориокарциному, опухоль Вильмса, злокачественную опухоль шейки матки, тестикулярную опухоль, семиному, карциному мочевого пузыря, меланому и опухоли ЦНС (такие как глиома (например, глиома ствола головного мозга и смешанные глиомы), глиобластома (также известная как мультиформная глиобластома), астроцитомы, лимфома ЦНС, герминома, медуллобластома, шваннома краниофарингиома, эпендимомы, пинеалома, гемангиобластома, акустическая неврома, олигодендроглиома, менингиома, нейробластома, ретинобластома и метастазы головного мозга).

В некоторых вариантах осуществления способы содействуют регрессии злокачественной опухоли. Содействие регрессии злокачественной опухоли у млекопитающего может включать лечение или предотвращение злокачественной опухоли у млекопитающего. Термины "лечить", "предотвращать" и "регрессировать", а также слова, происходящие от них, как используют в настоящем описании, не обязательно подразумевают 100% или полную регрессию. Наоборот, имеют место различные степени лечения, предотвращения и регрессии, среди которых специалист в данной области распознает те, которые имеют потенциальный эффект или терапевтический эффект. В этом отношении, патентоспособные способы могут обеспечивать любое количество любого уровня лечения, предотвращения или регрессии злокачественной опухоли у млекопитающего. Кроме того, лечение, предотвращение или регрессия, обеспечиваемые патентоспособным способом, могут включать лечение, предотвращение или регрессию одного или более состояний или симптомов заболевания, например, злокачественной опухоли. Также, для целей в настоящем описании, "лечение", "предотвращение" и "регрессия" могут охватывать задержку начала заболевания или его симптома или состояния.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты вводят в качестве части схемы лечения. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок вводят в качестве части схемы лечения. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты в комбинации со связывающим PD-L1 белком вводят в качестве части схемы лечения. В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты вводят в качестве части схемы лечения. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты представляют собой генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют с использованием вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой лентивирусной основе. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; фиг. 11A, 16A). В

некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; фиг. 11B, 16B). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе гаммаретровируса. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе pMSCiV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления T1L и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19H9. В некоторых вариантах осуществления T1L и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 38A1. В некоторых вариантах осуществления T1L и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная лег-

кая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

Способы создания цитотоксических лимфоцитов, генетически модифицированных для того, чтобы экспрессировать и секретировать растворимый связывающий лиганд 1 запрограммированной смерти 1 (PD-L1) белок

Способы создания генетически модифицированных цитотоксических лимфоцитов в соответствии с настоящим раскрытием могут включать одну или более из стадий выделения, генетической модификации и размножения, описанных выше.

В некоторых вариантах осуществления генетически цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты, полученные в соответствии с настоящим изобретением, генетически модифицированы с использованием вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; фиг. 11A, фиг. 16A). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; фиг. 11B, фиг. 16B). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе гаммаретровируса. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе рMSCIV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления, генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты генетически модифицированы для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19H9. В некоторых вариантах осуществления, генетически мо-

дифицированные цитотоксические лимфоциты генетически модифицированы для того, чтобы экспрессировать и секретировать 38A1. В некоторых вариантах осуществления, TIL и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или подающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или подающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах

осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

Наборы

Настоящее раскрытие также предусматривает наборы, содержащие одну или более композиций по настоящему раскрытию, например, выбранных из: (i) рассматриваемого связывающего PD-L1 белка (например, scFv, макситела и т.п.), например, в связи с любым вариантом осуществления, описанным в настоящем описании, (ii) одной или более нуклеиновых кислот (например, векторов), содержащих нуклеотидную последовательность(и), кодирующую рассматриваемый связывающий PD-L1 белок в соответствии с настоящим раскрытием, например, в связи с любым вариантом осуществления, описанным в настоящем описании, и (iii) одной или более генетически модифицированных клеток (например, цитотоксических лимфоцитов) (например, в композиции, содержащей один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов) в соответствии с настоящим раскрытием, например, в связи с любым вариантом осуществления, описанным в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты включают в набор. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок включают в набор. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты в комбинации со связывающим PD-L1 белком включают в набор. В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты в наборе. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты представляют собой генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления, T1L и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют с использованием вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; фиг. 11A, фиг. 16A). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; фиг. 11B, 16B). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе гаммаретровируса. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе рMSCIV. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 19H9. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на лентивирусной основе, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный вектор на основе pLEV, кодирующий 38A1. В некоторых вариантах осуществления T1L и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 19H9. В некоторых вариантах осуществления T1L и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать 38A1. В некоторых вариантах осуществления T1L и/или цитотоксические лимфоциты генетически модифицируют для того, чтобы экспрессировать и секретировать связывающий PD-L1 белок. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок содержит антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осу-

ществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную связывающую способность в меланоме по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых в анализе проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения числа PD-L1 положительных клеток, полученных с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение процентной доли PD-L1 положительных клеток, обнаруживаемых с помощью проточной цитометрии, по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления увеличенную связывающую способность измеряют посредством (i) определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) PD-L1 положительных клеток в анализе проточной цитометрии, которые метили с использованием связывающего PD-L1 белка, меченного с использованием или поддающегося обнаружению с помощью флуоресцентной метки, и (ii) сравнения MFI, получаемой с использованием связывающего PD-L1 белка, с контрольным антителом или сравнения с 19H9, где увеличение MFI общей клеточной популяции посредством проточной цитометрии с использованием связывающего PD-L1 белка по сравнению с контрольным антителом или 19H9 указывает на увеличение связывающей способности (см., например, анализ в примере 3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления белок 38A1 проявляет более высокую или увеличенную биологическую функцию в клетках Jurkat по сравнению с 19H9. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает блокаду вовлечения PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления биологическая функция включает ингибирование пути передачи сигнала PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления белок 19H9 проявляет более высокую или увеличенную способность к секреции в клетках Jurkat по сравнению с 38A1. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит CDR из SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) и указанная тяжелая цепь содержит CDR, содержащие SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 1 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осу-

шествления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 9, и указанная тяжелая цепь содержит последовательность, обладающую 90%, 95% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 9 и указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), дополнительно содержащий последовательность IgG1 (т.е. конъюгированный с последовательностью IgG1). В некоторых вариантах осуществления связывающий PD-L1 белок представляет собой одноцепочечный Fv (scFv), содержащий SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления конъюгация является непосредственной. В некоторых вариантах осуществления конъюгация происходит через линкер.

В некоторых случаях, рассматриваемый набор включает подходящий обучающий материал, например, для практической реализации способов, как раскрыто в настоящем описании, например, в связи с любым вариантом осуществления, описанным в настоящем описании.

Примеры неограничивающих аспектов раскрытия

Аспекты, в том числе варианты осуществления, данного объекта изобретения, описанные выше, могут быть полезны отдельно или в комбинации с одним или более другими аспектами или вариантами осуществления. Без ограничения вышеуказанного описания, определенные неограничивающие аспекты раскрытия с номерами 1-76 приведены далее. Как будет видно специалистам в данной области при прочтении этого раскрытия, каждый из индивидуально пронумерованных аспектов, можно использовать или комбинировать с любыми предшествующими или последующими индивидуально пронумерованными аспектами. Это предусмотрено для того, чтобы обеспечить основание для всех таких комбинаций аспектов, и не ограничено комбинациями аспектов, явно предоставленными далее.

1. Белок, который специфически связывается с PD-L1 и содержит антигенсвязывающую часть, которая содержит

(a) первый полипептид, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 2-4, и второй полипептид, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 6-8; или

(b) первый полипептид, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 10-12, и второй полипептид, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 14-16,

за тем исключением, что каждая из 3 аминокислотных последовательностей CDR первого и/или второго полипептида содержит две или меньше консервативных аминокислотных замен по отношению к точно определенному номеру SEQ ID.

2. Белок по п.1, в котором антигенсвязывающая часть содержит первый полипептид, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 2-4, и второй полипептид, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 6-8.

3. Белок по п.2, в котором первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5.

4. Белок по п.1, в котором антигенсвязывающая часть содержит первый полипептид, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 10-12, и второй полипептид, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 14-16.

5. Белок по п.4, в котором первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9, и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13.

6. Белок по любому из пп.1-5, в котором первый полипептид представляет собой легкую цепь и второй полипептид представляет собой тяжелую цепь.

7. Белок по любому из пп.1-6, в котором белок представляет собой одноцепочечное антитело (scFv) и первый и второй полипептиды сливаются непосредственно или через линкер друг с другом.

8. Белок по п.7, в котором scFv содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 19.

9. Белок по любому из пп.1-8, в котором белок представляет собой макситело, содержащее Fc домен иммуноглобулина, слитый непосредственно или через линкер с антигенсвязывающей частью.

10. Белок по п.9, в котором Fc домен иммуноглобулина представляет собой Fc домен IgG1.

11. Белок по п.10, в котором белок содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20.
12. Белок по п.9, в котором Fc домен иммуноглобулина представляет собой Fc домен IgG4.
13. Белок по любому из пп.1-6, в котором белок представляет собой гуманизированное антитело.
14. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую белок по любому из пп.1-13.
15. Нуклеиновая кислота по п.14, где нуклеиновая кислота содержит промотор, который функционально связан с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок.
16. Нуклеиновая кислота по п.15, в которой промотор представляет собой конститутивный промотор.
17. Нуклеиновая кислота по п.15, в котором промотор представляет собой индуцибельный промотор.
18. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по любому из пп.14-17.
19. Клетка по п.18, где нуклеиновую кислоту встраивают в геном клетки.
20. Клетка по п.18 или 19, где клетка представляет собой цитотоксический лимфоцит, генетически модифицированный для того, чтобы экспрессировать и секретировать белок.
21. Клетка по п.20, где цитотоксический лимфоцит представляет собой Т-клетку.
22. Клетка по п.21, где Т-клетка представляет собой CD8+ Т-клетку.
23. Клетка по п.21, где Т-клетка представляет собой CD4+ Т-хелперную клетку.
24. Клетка по п.21, где Т-клетку извлекают из периферической крови
25. Клетка по п.20, где цитотоксический лимфоцит представляет собой естественную киллерную (NK) клетку.
26. Клетка по п.25, где NK извлекают из периферической крови.
27. Клетка по п.20, где цитотоксический лимфоцит представляет собой инфильтрирующий опухоль лимфоцит (TIL), полученный из опухоли от субъекта.
28. Клетка по п.27, где TIL содержит рецептор со специфичностью к антигену из опухоли.
29. Клетка по любому из пп.20-28, где цитотоксический лимфоцит демонстрирует повышенный уровень экспрессии одного или более антигенов активации относительно наивной Т-клетки.
30. Клетка по п.29, где один или более антигенов активации выбирают из CD25, CD26, CD27, CD28, CD38, CD40L, CD69, CD134, CD137, BTLA, PD-1, HVEM, LIGHT и HLA-DR.
31. Клетка по п.29 или 30, где цитотоксический лимфоцит содержит Т-клеточный рецептор со специфичностью к опухолеассоциированному антигену.
32. Способ, включающий генетическую модификацию цитотоксического лимфоцита, выделенного из опухоли субъекта, посредством введения в цитотоксический лимфоцит нуклеиновой кислоты по любому из пп.14-17, где генетически модифицированный цитотоксический лимфоцит экспрессирует и секретирует белок, который специфически связывается с PD-L1; размножение генетически модифицированного цитотоксического лимфоцита для того, чтобы создавать популяцию генетически модифицированных цитотоксических лимфоцитов; и введение популяции генетически модифицированных цитотоксических лимфоцитов субъекту для того, чтобы лечить опухоль.
33. Способ по п.32, в котором генетически модифицированный цитотоксический лимфоцит конститутивно экспрессирует белок, который специфически связывается с PD-L1.
34. Способ по п.32, в котором генетически модифицированный цитотоксический лимфоцит индуцибельно экспрессирует белок, который специфически связывается с PD-L1.
35. Способ по любому из пп.32-34, в котором нуклеиновая кислота встраивается в геном цитотоксического лимфоцита.
36. Способ по любому из пп.32-35, в котором цитотоксический лимфоцит представляет собой Т-клетку.
37. Способ по п.36, в котором Т-клетка представляет собой CD8+ Т-клетку.
38. Способ по п.36, в котором Т-клетка представляет собой CD4+ Т-хелперную клетку.
39. Способ по любому из пп.32-35, в котором цитотоксический лимфоцит представляет собой естественную киллерную (NK) клетку.
40. Способ по любому из пп.32-39, в котором генетически модифицированный цитотоксический лимфоцит содержит рецептор со специфичностью к антигену из опухоли.
41. Способ по любому из пп.32-40, который включает выделение цитотоксического лимфоцита у субъекта перед генетической модификацией.
42. Способ по любому из пп.32-41, в котором указанный белок, который специфически связывается с PD-L1 и содержит антигенсвязывающую часть, которая содержит
 - (а) первый полипептид, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 2-4, и второй полипептид, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 6-8; или
 - (б) первый полипептид, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 10-12, и второй полипептид, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, при-

веденные в SEQ ID NO: 14-16,

за тем исключением, что каждая из 3 аминокислотных последовательностей CDR первого и/или второго полипептида содержит две или меньше консервативных аминокислотных замен по отношению к точно определенному номеру SEQ ID.

43. Способ по п.42, в котором указанная антигенсвязывающая часть содержит первый полипептид, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 2-4, и второй полипептид, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 6-8.

44. Способ по п.43, в котором первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5.

45. Способ по п.42, в котором антигенсвязывающая часть содержит первый полипептид, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 10-12, и второй полипептид, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 14-16.

46. Способ по п.45, в котором первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9, и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13.

47. Способ по любому из пп.42-46, в котором первый полипептид представляет собой легкую цепь и второй полипептид представляет собой тяжелую цепь.

48. Способ по любому из пп.42-47, в котором белок представляет собой одноцепочечное антитело (scFv) и первый и второй полипептиды сливаются непосредственно или через линкер друг с другом.

49. Способ по п.48, в котором scFv содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 19.

50. Способ по любому из пп.42-49, в котором белок представляет собой макситело, содержащее Fc домен иммуноглобулина, слитый непосредственно или через линкер с антигенсвязывающей частью.

51. Способ по п.50, в котором Fc домен иммуноглобулина представляет собой Fc домен IgG1.

52. Способ по п.51, в котором белок содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20.

53. Способ получения генетически модифицированного цитотоксического лимфоцита, способ включает генетическую модификацию цитотоксического лимфоцита, выделенного у субъекта, который имеет или предположительно имеет злокачественную опухоль, посредством введения в цитотоксический лимфоцит нуклеиновой кислоты по любому из пп.14-17, где генетически модифицированный цитотоксический лимфоцит экспрессирует и секретирует белок, который специфически связывается с PD-L1.

54. Способ по п.53, в котором генетически модифицированный цитотоксический лимфоцит конститутивно экспрессирует белок, который специфически связывается с PD-L1.

55. Способ по п.53, в котором генетически модифицированный цитотоксический лимфоцит индуцибельно экспрессирует белок, который специфически связывается с PD-L1.

56. Способ по любому из пп.53-55, который включает размножение цитотоксического лимфоцита *in vitro* для того, чтобы предоставлять размноженную популяцию генетически модифицированных цитотоксических лимфоцитов.

57. Способ по любому из пп.53-56, который включает выделение цитотоксического лимфоцита у субъекта перед генетической модификацией.

58. Способ по п.57, в котором выделение включает выделение цитотоксического лимфоцита из опухоли субъекта.

59. Способ по любому из пп.57, в котором выделение включает выделение цитотоксического лимфоцита из периферической крови субъекта.

60. Способ по любому из пп.53-59, в котором цитотоксический лимфоцит представляет собой Т-клетку.

61. Способ по п.60, в котором Т-клетка представляет собой CD8+ Т-клетку.

62. Способ по п.60, в котором Т-клетка представляет собой CD4+ Т-хелперную клетку.

63. Способ по любому из пп.53-59, в котором цитотоксический лимфоцит представляет собой естественную киллерную (NK) клетку.

64. Способ по любому из пп.53-63, в котором нуклеиновая кислота встраивается в геном цитотоксического лимфоцита.

65. Способ по любому из пп.53-64, в котором цитотоксический лимфоцит демонстрирует повышенный уровень экспрессии одного или более антигенов активации относительно наивной Т-клетки.

66. Способ по п.65, в котором один или более антигенов активации выбирают из CD25, CD26, CD27, CD28, CD38, CD40L, CD69, CD134, CD137, BTLA, PD-1, HVEM, LIGHT и HLA-DR.

67. Способ по п.65 или 66, в котором генетически модифицированный цитотоксический лимфоцит содержит Т-клеточный рецептор со специфичностью к антигену из опухоли субъекта.

68. Способ лечения индивидуума, который имеет или предположительно имеет злокачественную опухоль, способ включает введение белка, который специфически связывается с PD-L1, в соответствии с любым из пп.1-13 индивидууму.

69. Способ по п.68, в котором введение включает введение субъекту нуклеиновой кислоты, кодирующей белок.
70. Способ по п.68, в котором введение включает введение субъекту генетически модифицированного цитотоксического лимфоцита, который экспрессирует и секретирует белок.
71. Способ по п.70, в котором генетически модифицированный цитотоксический лимфоцит конститутивно экспрессирует белок.
72. Способ по п.71, в котором генетически модифицированный цитотоксический лимфоцит индуцибельно экспрессирует белок.
73. Способ по п.72, который включает индукцию экспрессии белка.
74. Способ по любому из пп.70-73, в котором цитотоксический лимфоцит представляет собой Т-клетку.
75. Способ по п.74, в котором Т-клетка представляет собой CD8+ Т-клетку.
76. Способ по п.74, в котором Т-клетка представляет собой CD4+ Т-хелперную клетку.
77. Способ по любому из пп.70-73, в котором цитотоксический лимфоцит представляет собой естественную киллерную (NK) клетку.
78. Способ по любому из пп.70-77, в котором цитотоксический лимфоцит демонстрирует повышенный уровень экспрессии одного или более антигенов активации относительно наивной Т-клетки.
79. Способ по п.78, в котором один или более антигенов активации выбирают из CD25, CD26, CD27, CD28, CD38, CD40L, CD69, CD134, CD137, BTLA, PD-1, HVEM, LIGHT и HLA-DR.
80. Способ по п.78 или 79, в котором генетически модифицированный цитотоксический лимфоцит содержит Т-клеточный рецептор со специфичностью к антигену из опухоли субъекта.
81. Способ уменьшения взаимодействия между PD-L1 на первой клетке и PD-1 на второй клетке, способ включает контакт PD-L1 на первой клетке с белком по любому из пп.1-13.
82. Способ по п.81, в котором первая и вторая клетки находятся в индивидууме, и контакт включает введение белка по любому из пп.1-13 индивидууму.
83. Способ по п.82, в котором введение включает системное введение.
84. Способ по п.82, в котором введение включает местное введение.
85. Способ по п.84, в котором местное введение включает внутриопухольное введение.
86. Способ по любому из пп.81-85, в котором индивидуум имеет злокачественную опухоль.
87. Способ по п.87, в котором индивидуум имеет солидную опухоль.

Примеры

Как можно понять из раскрытия, приведенного выше, настоящее раскрытие имеет широкий спектр применений. Соответственно, следующие примеры приведены с тем, чтобы предоставить средним специалистам в данной области полное раскрытие и описание того, как получать и использовать настоящее изобретение, и не предназначены ни для того, чтобы ограничивать объем того, что авторы изобретения рассматривают в качестве своего изобретения, ни для того, чтобы показать, что нижеследующие эксперименты представляют собой все или исключительные эксперименты, которые выполнены. Специалисты в данной области легко распознают различные некритические параметры, которые можно менять или модифицировать, чтобы достигать по существу схожих результатов. Предприняты усилия, чтобы обеспечить точность в отношении используемых чисел (например, количеств, температуры и т.д.), но некоторые экспериментальные ошибки и отклонения следует принимать во внимание. Если не указано иное, части представляют собой массовые части, молекулярная масса представляет собой средневзвешенную молекулярную массу, температура приведена в градусах Цельсия и давление равно атмосферному или близко к нему. Могут быть использованы стандартные сокращения, например, п.о., пара(ы) оснований; т.о., тысяча(и) оснований; пл, пиколитр(ы); с, секунда(ы); мин, минута(ы); ч, час(ы); а.к., аминокислота(ы); н., нуклеотид(ы); и т.п.

Пример 1. Связывающие PD-L1 белки с антигенсвязывающей частью.

Создавали рекомбинантные антитела со специфичностью к PD-L1 (scFV против PD-L1, слитый с Fc доменом человека из IgG человека). Используя scFV библиотеку фагового дисплея (Viva Biotechnologies), выделяли несколько scFV со специфичностью к PD-L1. Два scFV, которые связывались с нативным PD-L1, получили названия 38A1 и 19H9. 38A1-scFV, 19H9-scFV и FMC63-scFV (scFV против CD19 отрицательного контроля), сливали с Fc доменом из IgG1 человека (38A1-scFV-Fc, 19H9-scFV-Fc и FMC63-scFV-Fc). Их конструировали в лентивирусных и ретровирусных плаزمиде с использованием рекомбинации фага λ "Gateway" с несколькими сайтами (например, см. фиг. 1). Каждую последовательность scFV фланкировали сайтами рекомбинации attL1 и attR5, синтезированными с помощью Geneart (Life Technologies), и субклонировали в рМК. Последовательность для Fc IgG1 фланкировали сайтами рекомбинации attL5 и attL2, синтезированными с помощью Geneart (Life Technologies), и субклонировали в рМК. Каждый scFV рекомбинировали с IgG1-Fc в лентивирусной плазмиде (pLVU3pIRESeGFP; фиг. 2) или ретровирусной плазмиде (pMSCVIRESeGFP; фиг. 3). Рекомбинированные конструкции состоят из слияния scFv (38A1, 19H9 или FMC63), слитого с IgG1-Fc через сайт рекомбинации attB5.

Для того чтобы определять аффинность максител 38A1-scFV-Fc (SEQ ID NO: 17) и 19H9-scFV-Fc (SEQ ID NO: 19) к PD-L1 (с использованием 12D10-scFV-Fc, реактив со специфичностью к ассоцииро-

ваным с микротрубочками белкам, в качестве отрицательного контроля), осуществляли "ELISA на основе клеток" с использованием 293-PD-L1. Наблюдали аффинность 38A1-scFV-Fc ($EC_{50}=0,1248$), которая в 3,2 раза превышала таковую для 19H9-scFV-Fc ($EC_{50}=0,4039$; фиг. 5).

T-клетки Jurkat трансдуцировали лентивирусом, кодирующим 38A1-scFV-Fc, 19H9-scFV-Fc или FMC63-scFV-Fc. 293-PD-L1 совместно культивировали при соотношении 1:1 в течение 16 ч с T-клетками Jurkat, стабильно секретирующими 38A1-scFV-Fc, 19H9-scFV-Fc или FMC63-scFV-Fc. Авторы изобретения обнаруживали, что 38A1-scFV-Fc, 19H9-scFV-Fc, но не FMC63-scFV-Fc, связывали 293-PD-L1. По сравнению с 19H9-scFV-Fc, авторы изобретения наблюдали больше чем 1,5-кратное усиление связывания 38A1-scFV-Fc с 293-PD-L1 (фиг. 5). Этот результат находится в соответствии с более высокой аффинностью 38A1-scFV-Fc по сравнению с 19H9-scFV-Fc к PD-L1.

Линии TIL M1034 и M1015 трансдуцировали с использованием лентивируса, кодирующего 38A1-scFV-Fc, 19H9-scFV-Fc или FMC63-scFV-Fc. После сортировки по корепортеру eGFP и размножения *in vitro*, собирали супернатанты с TIL, секретирующих FMC63-scFV-Fc и 38A1-scFV-Fc, концентрировали их 10-кратно и использовали для того, чтобы окрашивать 293-PD-L1. По сравнению с максителом отрицательного контроля (FMC63-scFV-Fc), авторы изобретения наблюдали больше чем 50-кратное увеличение связывания 38A1-scFV-Fc с 293-PD-L1 (фиг. 6).

Затем тестировали способность 38A1-scFV-Fc и 19H9-scFV-Fc ослаблять ингибирование T-клеточной активности, заблокированной посредством PD-L1. Чтобы выполнить это, 12D10-scFV-Fc (отрицательный контроль со специфичностью к ассоциированным с микротрубочками белкам), 19H9-scFV-Fc и 38A1-scFV-Fc добавляли в совместную культуру T-клеток Jurkat, которые продуцируют люциферазу светляка, когда активированы, и клеток CHO, сконструированных для того, чтобы активировать T-клетки, но также ингибировать такую активацию через сверхэкспрессию PD-L1, как описано выше. Добавление 38A1-scFV-Fc и 19H9-scFV-Fc, но не 12D10-scFV-Fc, к совместной культуре Jurkat/CHO вело к увеличенной биолуминесцентной активности. В обоих случаях "деингибирование" PD-L1 зависело от дозы. Способность 38A1-scFV-Fc индуцировать биолуминесцентную активность, больше чем в 3,6 раза превышала таковую для 19H9-scFV-Fc, в соответствии с наблюдаемым 3,2-кратным различием в аффинности к PD-L1 (фиг. 7).

Пример 2. Получение TIL, экспрессирующих PD-L1 scFv.

Получение вирусов.

Стадии способа.

1) Высевать 5×10^6 клеток Phoenix в 10 мм тканевую культуральную чашку, содержащую 5 мл клеточных культуральных сред.

2) Трансфицировать клетки с использованием 10 мкг pLEV (лентивирусный вектор), содержащего scFV против PD-1, и 6 мкг pVSV-G с использованием липофектамина.

3) После 60 ч собрать супернатант и фильтровать с использованием 70 мкМ уловителя в 15 мл пробирку.

Трансдукция T-клеток.

Стадии способа.

1) Активировать 1×10^6 TIL с использованием средства против CD3 в концентрации 300 нг/мл в 2 мл среды для культивирования TIL в 12-луночном планшете.

2) После 48 ч разделить TIL на две лунки и добавить 1 мл супернатанта (со стадии 3 при получении вирусов) в каждую лунку вместе с полибренном в концентрации 8 мкг/мл.

3) Центрифугировать клетки в течение 30 мин на $800 \times g$ при $32^\circ C$.

4) Удалить содержащую вирус среду и ресуспендировать клеточный осадок с использованием 2 мл свежих полных сред для культивирования и инкубировать клетки в течение 24 ч.

5) Размножить клетки с использованием протокола быстрого размножения (REP).

Пример 3. Определение характеристик 19H9 и 38A1.

19H9 проявляет более высокую способность к секреции.

Цель: сравнивать способность к секреции у клеток Jurkat, чрезмерно экспрессирующих ScFV против PD-L1 клона 19H9, с 38A1.

В общем 19H9 проявляет более высокую способность к секреции. Сравнение способности к секреции у клеток Jurkat, чрезмерно экспрессирующих ScFV против PD-L1 клона 19H9, с 38A1 приведено на фиг. 12. Супернатант от клеток Jurkat, чрезмерно экспрессирующих ScFV против PD-L1 клона 19H9 и 38A1, собирали и концентрировали для анализа ELISA IgG для того, чтобы определять концентрацию ScFV против PD-L1. Обнаружено, что клетки Jurkat клона 19H9 имели более высокую способность к секреции по сравнению с 38A1 (9,82 против 6,75 мкг/клетки).

38A1 демонстрирует более высокую связывающую способность в клетках Jurkat, чрезмерно экспрессирующих PD-L1.

Цель: исследовать аффинность связывания ScFV против PD-L1 клона 19H9 и 38A1 с использованием клеток EL4 PD-L1.

В общем 38A1 демонстрирует более высокую связывающую способность в клетках Jurkat, чрезмерно

но экспрессирующих PD-L1. Исследовали аффинность связывания ScFV против PD-L1 клона 19H9 и 38A1 с использованием клеток EL4 PD-L1 (фиг. 13). EL4 PD-L1 инкубировали с ScFV против PD-L1 клона 19H9 или 38A1 в концентрации 1, 3, 10, 30, 100 и 300 нг/мл и окрашивали с использованием Амсуап и FITC козы против человека. Клетки промывали буфером FACs и анализировали посредством проточной цитометрии. Клон 38A1 демонстрировал более высокую связывающую способность в клетках Jurkat, чрезмерно экспрессирующих PD-L1, как по процентной доле PD-L1 положительных клеток (фиг. 13A), так и средней интенсивности флуоресценции (MFI) (фиг. 13B).

38A1 демонстрирует более высокую связывающую способность в опухолевых клетках меланомы.

Цель: валидировать связывание ScFV против PD-L1 в опухолевых клетках.

В целом 38A1 демонстрирует более высокую связывающую способность в опухолевых клетках меланомы. Сравнение аффинности связывания ScFV против PD-L1 клона 19H9 и 38A1 с использованием клеток EL4 PD-L1 приведено на фиг. 14. EL4 PD-L1 инкубировали с ScFV против PD-L1 клона 19H9 или 38A1 в концентрации 1, 3, 10, 30, 100 и 300 нг/мл и окрашивали с использованием Амсуап и FITC козы против человека. Клетки промывали буфером FACs и анализировали посредством проточной цитометрии. Клон 38A1 демонстрировал более высокую связывающую способность в клетках Jurkat, чрезмерно экспрессирующих PD-L1, как по процентной доле PD-L1 положительных клеток (фиг. 14A), так и по средней интенсивности флуоресценции (MFI) (фиг. 14B). Для того чтобы валидировать связывание ScFV против PD-L1 в опухолевых клетках, три опухолевые клетки меланомы обрабатывали использованием IFN- γ (100 нг/мл), чтобы усиливать экспрессию PD-L1. После трех суток, клетки собирали с использованием буфера для диссоциации клеток, инкубировали с ScFV против PD-L1 клона 19H9 или 38A1 в концентрации 100 нг/мл и окрашивали с использованием FITC козы против человека. Клетки промывали буфером FACs и анализировали посредством проточной цитометрии. Авторы изобретения обнаруживали, что клон 38A1 демонстрировал более высокую аффинность связывания как по процентной доле PD-L1 положительных клеток, так и по MFI. В целом, клон 38A1 имеет более высокую аффинность связывания, но слегка меньшую способность к секреции по сравнению с клоном 19H9.

38A1 демонстрирует более высокую биологическую функцию.

Цель: дополнительно охарактеризовать биологическую функцию двух клонов ScFV против PD-L1 (19H9 и 38A1).

В целом 38A1 демонстрирует более высокую биологическую функцию, чем 19H9. Для того чтобы дополнительно определять биологическую функцию двух клонов ScFV против PD-L1 (19H9 и 38A1), проводили анализ блокады PD-L1, который можно использовать для того, чтобы определять силу антитела против PD-1 или PD-L1, которое блокирует вовлечение во взаимодействие PD-1 и PD-L1 (фиг. 15). Анализ состоит из двух генетически сконструированных клеточных линий: PD-1 эффекторная клетка (Т-клетки Jurkat, стабильно экспрессирующие PD-1 человека и NFAT-индуцируемую люциферазу) и клетки PD-L1 аАРС/СНО-К1, стабильно экспрессирующие PD-L1 человека с белком клеточной поверхности, активирующим когнатные TCR. Когда клетки двух типов культивировали совместно, вовлечение PD-1 и PD-L1 ингибировало передачу TCR сигналов и снижало активность люциферазы. Добавление блокирующего антитела против PD-1 или PD-L1 помогало освободиться от ингибирующего сигнала, что вело к усиленной передаче сигналов TCR и NFAT-опосредованной активности люциферазы. Обнаруживали, что сигнал люциферазы (RLU) больше при блокировании с использованием средства против PD-L1 по сравнению со средством против PD-1, что подсказывает, что блокирование PD-L1 казалось более эффективным, чем PD-1 в этом контексте (фиг. 15A). В соответствии с ожиданиями, ScFV против PD-L1 клона 38A1, у которого ранее демонстрировали наличие более высокой аффинности связывания, обеспечивал более высокую биологическую функцию из-за сильно увеличенного сигнала люциферазы как в условиях очищенного ScFV (P), так и в не очищенных (NP) условиях (фиг. 15B).

Предшествующее лишь иллюстрирует принципы изобретения. Следует принимать во внимание, что специалисты в данной области смогут придумать различные схемы, которые, несмотря на то, что явно не описаны или не представлены в настоящем описании, осуществляют принципы изобретения и включены в его сущность и объем. Кроме того, все примеры и условные формулировки, перечисленные в настоящем описании, преимущественно предназначены для того, чтобы помочь читателю в понимании принципов изобретения, без ограничения такими конкретно перечисленными примерами и условиями. Кроме того, все утверждения в настоящем описании, где заявлены принципы, аспекты и варианты осуществления изобретения, а также их конкретные примеры, предназначены для того, чтобы охватывать как структурные, так и функциональные их эквиваленты. Дополнительно подразумевают, что такие эквиваленты включают как в настоящее время известные эквиваленты, так и эквиваленты, которые будут разработаны в будущем, т.е. любые разработанные элементы, которые выполняют ту же функцию, независимо от структуры. Следовательно, не предусмотрено, что объем настоящего изобретения ограничен образцовыми вариантами осуществления, представленными и описанными в настоящем описании. Скорееобъем и сущность настоящего изобретения воплощены в приложенной формуле изобретения.

Примеры, которые изложены выше, приведены для того, чтобы предоставить средним специалистам в данной области полное раскрытие и описание того, как получать и использовать варианты осуществления композиций, систем и способов по изобретению, и не предназначены для того, чтобы ограни-

чивать объем того, что авторы изобретения рассматривают в качестве своего изобретения. Модификации описанных выше способов осуществления изобретения, которые очевидны специалистам в данной области, предназначены входить в объем следующей формулы изобретения. Все патенты и публикации, упомянутые в описании, отражают уровни навыков специалистов в области, к которой относится изобретение. Все источники, цитируемые в этом раскрытии, включены по ссылке в той же степени, как если бы каждый источник был включен по ссылке в полном объеме индивидуально.

Все заголовки и обозначения разделов используют только для целей прозрачности и отсылки, и их не следует толковать в качестве ограничения каким-либо образом. Например, специалисты в данной области примут во внимание применимость объединения различных аспектов из различных заголовков и разделов в зависимости от ситуации в соответствии с сущностью и объемом изобретения, описанного в настоящем описании.

Все цитируемые в данном описании ссылки включены, таким образом, посредством ссылки в настоящем описании во всей их полноте и для всех целей в той же степени, как если бы каждую индивидуальную публикацию или патент или патентную заявку конкретно и индивидуально указывали для того, чтобы включить по ссылке в полном объеме для всех целей.

Многие модификации и вариации этой заявке можно выполнить, не отступая от ее сущности и объема, как будет очевидно специалистам в данной области. Конкретные варианты осуществления и примеры, описанные в настоящем описании, даны только в качестве примера, и заявка подлежит ограничению только терминами из приложенной формулы изобретения, наряду с полным объемом эквивалентов, на которые дает право формула изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Белок, который специфически связывается с PD-L1 и содержит антигенсвязывающую часть, которая содержит первый полипептид, представляющий собой легкую цепь, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 2-4, и второй полипептид, представляющий собой тяжелую цепь, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 6-8.

2. Белок по п.1, в котором первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5.

3. Белок, который специфически связывается с PD-L1 и содержит антигенсвязывающую часть, которая содержит первый полипептид, представляющий собой легкую цепь, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 10-12, и второй полипептид, представляющий собой тяжелую цепь, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 14-16.

4. Белок по п.3, в котором первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9, и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13.

5. Белок по любому из пп.1-4, где белок представляет собой одноцепочечное антитело (scFv) и первый и второй полипептиды сливаются непосредственно или через линкер друг с другом.

6. Белок по п.5, где scFv содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 19.

7. Белок по любому из пп.1-6, где белок представляет собой макситело, содержащее Fc домен иммуноглобулина, слитый непосредственно или через линкер с антигенсвязывающей частью.

8. Белок по п.7, в котором Fc домен иммуноглобулина представляет собой Fc домен IgG1.

9. Белок по п.8, где белок содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20.

10. Белок по п.7, в котором Fc домен иммуноглобулина представляет собой Fc домен IgG4.

11. Белок по любому из пп.1-4, где белок представляет собой гуманизированное антитело.

12. Нуклеиновая кислота, кодирующая белок по любому из пп.1-11.

13. Нуклеиновая кислота по п.12, где нуклеиновая кислота содержит промотор, который функционально связан с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок.

14. Нуклеиновая кислота по п.13, в которой промотор представляет собой конститутивный промотор.

15. Нуклеиновая кислота по п.13, в которой промотор представляет собой индуцибельный промотор.

16. Цитотоксический лимфоцит, генетически модифицированный для того, чтобы экспрессировать и секретировать белок по любому из пп.1-11, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп.12-15.

17. Цитотоксический лимфоцит по п.16, где нуклеиновую кислоту встраивают в геном клетки.

18. Цитотоксический лимфоцит по п.16 или 17, где цитотоксический лимфоцит представляет собой Т-клетку.

19. Цитотоксический лимфоцит по п.18, где Т-клетка представляет собой CD8+ Т-клетку.

20. Цитотоксический лимфоцит по п.18, где Т-клетка представляет собой CD4+ Т-хелперную клетку.

21. Цитотоксический лимфоцит по п.18, где Т-клетку извлекают из периферической крови.
22. Цитотоксический лимфоцит по п.16 или 17, где цитотоксический лимфоцит представляет собой естественную киллерную (NK) клетку.
23. Цитотоксический лимфоцит по п.22, где NK извлекают из периферической крови.
24. Цитотоксический лимфоцит по п.16 или 17, где цитотоксический лимфоцит представляет собой инфильтрирующий опухоль лимфоцит (TIL), полученный из опухоли от субъекта.
25. Цитотоксический лимфоцит по п.24, где TIL содержит рецептор со специфичностью к антигену из опухоли.
26. Цитотоксический лимфоцит по любому из пп.16-25, где цитотоксический лимфоцит демонстрирует повышенный уровень экспрессии одного или более антигенов активации относительно наивной Т-клетки.
27. Цитотоксический лимфоцит по п.26, где один или более антигенов активации выбирают из CD25, CD26, CD27, CD28, CD38, CD40L, CD69, CD134, CD137, BTLA, PD-1, HVEM, LIGHT и HLA-DR.
28. Цитотоксический лимфоцит по п.26 или 27, где цитотоксический лимфоцит содержит Т-клеточный рецептор со специфичностью к опухолеассоциированному антигену.
29. Способ лечения злокачественной опухоли, включающий генетическую модификацию цитотоксического лимфоцита, выделенного из опухоли субъекта, посредством введения в цитотоксический лимфоцит нуклеиновой кислоты по любому из пп.12-15, где генетически модифицированный цитотоксический лимфоцит экспрессирует и секретирует белок, который специфически связывается с PD-L1;
размножение генетически модифицированного цитотоксического лимфоцита для того, чтобы создавать популяцию генетически модифицированных цитотоксических лимфоцитов; и
введение популяции генетически модифицированных цитотоксических лимфоцитов субъекту для того, чтобы лечить опухоль.
30. Способ по п.29, в котором генетически модифицированный цитотоксический лимфоцит конститутивно экспрессирует белок, который специфически связывается с PD-L1.
31. Способ по п.29, в котором генетически модифицированный цитотоксический лимфоцит индуцибельно экспрессирует белок, который специфически связывается с PD-L1.
32. Способ по любому из пп.29-31, в котором нуклеиновую кислоту встраивают в геном цитотоксического лимфоцита.
33. Способ по любому из пп.29-32, в котором цитотоксический лимфоцит представляет собой Т-клетку.
34. Способ по п.33, в котором Т-клетка представляет собой CD8+ Т-клетку.
35. Способ по п.33, в котором Т-клетка представляет собой CD4+ Т-хелперную клетку.
36. Способ по любому из пп.29-32, в котором цитотоксический лимфоцит представляет собой естественную киллерную (NK) клетку.
37. Способ по любому из пп.29-36, в котором генетически модифицированный цитотоксический лимфоцит содержит рецептор со специфичностью к антигену из опухоли.
38. Способ по любому из пп.29-37, который включает выделение цитотоксического лимфоцита у субъекта перед генетической модификацией.
39. Способ по любому из пп.29-38, в котором указанный белок, который специфически связывается с PD-L1, содержит антигенсвязывающую часть, которая содержит:
(а) первый полипептид, представляющий собой легкую цепь, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 2-4, и второй полипептид, представляющий собой тяжелую цепь, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 6-8; или
(б) первый полипептид, представляющий собой легкую цепь, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 10-12, и второй полипептид, представляющий собой тяжелую цепь, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 14-16.
40. Способ по п.39, в котором указанная антигенсвязывающая часть содержит первый полипептид, представляющий собой легкую цепь, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 2-4, и второй полипептид, представляющий собой тяжелую цепь, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 6-8.
41. Способ по п.40, в котором первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5.
42. Способ по п.39, в котором антигенсвязывающая часть содержит первый полипептид, представляющий собой легкую цепь, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 10-12, и второй полипептид, представляющий собой тяжелую цепь, содержащий 3 аминокислотные последовательности CDR, приведенные в SEQ ID NO: 14-16.
43. Способ по п.42, в котором первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9, и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность,

приведенную в SEQ ID NO: 13.

44. Способ по любому из пп.39-43, в котором белок представляет собой одноцепочечное антитело (scFv) и первый и второй полипептиды сливаются непосредственно или через линкер друг с другом.

45. Способ по п.44, в котором scFv содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 19.

46. Способ по любому из пп.39-45, в котором белок представляет собой макситело, содержащее Fc домен иммуноглобулина, слитый непосредственно или через линкер с антигенсвязывающей частью.

47. Способ по п.46, в котором Fc домен иммуноглобулина представляет собой Fc домен IgG1.

48. Способ по п.47, в котором белок содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20.

49. Способ получения генетически модифицированного цитотоксического лимфоцита, где способ включает генетическую модификацию цитотоксического лимфоцита, выделенного у субъекта, который имеет или предположительно имеет злокачественную опухоль, посредством введения в цитотоксический лимфоцит нуклеиновой кислоты по любому из пп.12-15, где в результате указанной генетической модификации генетически модифицированный цитотоксический лимфоцит становится способным экспрессировать и секретировать белок, который специфически связывается с PD-L1.

50. Способ по п.49, в котором генетически модифицированный цитотоксический лимфоцит конститутивно экспрессирует белок, который специфически связывается с PD-L1.

51. Способ по п.49, в котором генетически модифицированный цитотоксический лимфоцит индуцибельно экспрессирует белок, который специфически связывается с PD-L1.

52. Способ по любому из пп.49-51, который включает размножение цитотоксического лимфоцита *in vitro* для того, чтобы предоставлять размноженную популяцию генетически модифицированных цитотоксических лимфоцитов.

53. Способ по любому из пп.49-52, который включает выделение цитотоксического лимфоцита у субъекта перед генетической модификацией.

54. Способ по п.53, в котором выделение включает выделение цитотоксического лимфоцита из опухоли субъекта.

55. Способ по п.53, в котором выделение включает выделение цитотоксического лимфоцита из периферической крови субъекта.

56. Способ по любому из пп.49-55, в котором цитотоксический лимфоцит представляет собой Т-клетку.

57. Способ по п.56, в котором Т-клетка представляет собой CD8+ Т-клетку.

58. Способ по п.56, в котором Т-клетка представляет собой CD4+ Т-хелперную клетку.

59. Способ по любому из пп.49-55, в котором цитотоксический лимфоцит представляет собой естественную киллерную (NK) клетку.

60. Способ по любому из пп.49-59, в котором нуклеиновую кислоту встраивают в геном цитотоксического лимфоцита.

61. Способ по любому из пп.49-60, в котором цитотоксический лимфоцит демонстрирует повышенный уровень экспрессии одного или более антигенов активации относительно наивной Т-клетки.

62. Способ по п.61, в котором один или более антигенов активации выбирают из CD25, CD26, CD27, CD28, CD38, CD40L, CD69, CD134, CD137, BTLA, PD-1, HVEM, LIGHT и HLA-DR.

63. Способ по п.61 или 62, в котором генетически модифицированный цитотоксический лимфоцит содержит Т-клеточный рецептор со специфичностью к антигену из опухоли субъекта.

64. Способ лечения злокачественной опухоли у индивидуума, который имеет или предположительно имеет злокачественную опухоль, где способ включает введение белка, который специфически связывается с PD-L1 в соответствии с любым из пп.1-11, индивидууму.

65. Способ лечения злокачественной опухоли у индивидуума, который имеет или предположительно имеет злокачественную опухоль, где способ включает введение субъекту нуклеиновой кислоты по любому из пп.12-15.

66. Способ лечения злокачественной опухоли у индивидуума, который имеет или предположительно имеет злокачественную опухоль, где способ включает введение субъекту генетически модифицированного цитотоксического лимфоцита, который экспрессирует и секретирует белок по любому из пп.1-11.

67. Способ по п.66, в котором генетически модифицированный цитотоксический лимфоцит конститутивно экспрессирует белок.

68. Способ по п.67, в котором генетически модифицированный цитотоксический лимфоцит индуцибельно экспрессирует белок.

69. Способ по п.68, который включает индукцию экспрессии белка.

70. Способ по любому из пп.66-69, в котором цитотоксический лимфоцит представляет собой Т-клетку.

71. Способ по п.70, в котором Т-клетка представляет собой CD8+ Т-клетку.

72. Способ по п.70, в котором Т-клетка представляет собой CD4+ Т-хелперную клетку.

73. Способ по любому из пп.66-69, в котором цитотоксический лимфоцит представляет собой есте-

ственную киллерную (NK) клетку.

74. Способ по любому из пп.66-73, в котором цитотоксический лимфоцит демонстрирует повышенный уровень экспрессии одного или более антигенов активации относительно наивной Т-клетки.

75. Способ по п.74, в котором один или более антигенов активации выбирают из CD25, CD26, CD27, CD28, CD38, CD40L, CD69, CD134, CD137, BTLA, PD-1, HVEM, LIGHT и HLA-DR.

76. Способ по п.74 или 75, в котором генетически модифицированный цитотоксический лимфоцит содержит Т-клеточный рецептор со специфичностью к антигену из опухоли субъекта.

77. Способ уменьшения взаимодействия между PD-L1, который присутствует на первой клетке, и PD-1, который присутствует на второй клетке, где способ включает контакт PD-L1 на первой клетке с белком по любому из пп.1-11, где первая и вторая клетки находятся в индивидууме, и контакт включает введение белка по любому из пп.1-11 индивидууму.

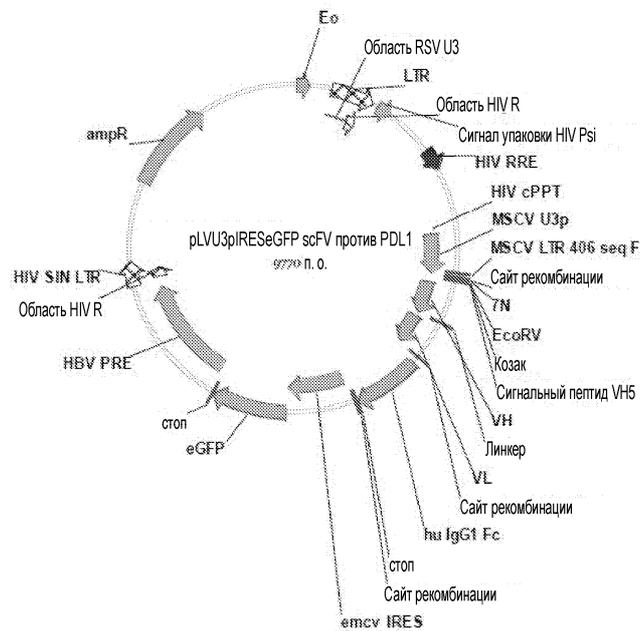
78. Способ по п.77, в котором введение включает системное введение.

79. Способ по п.77, в котором введение включает местное введение.

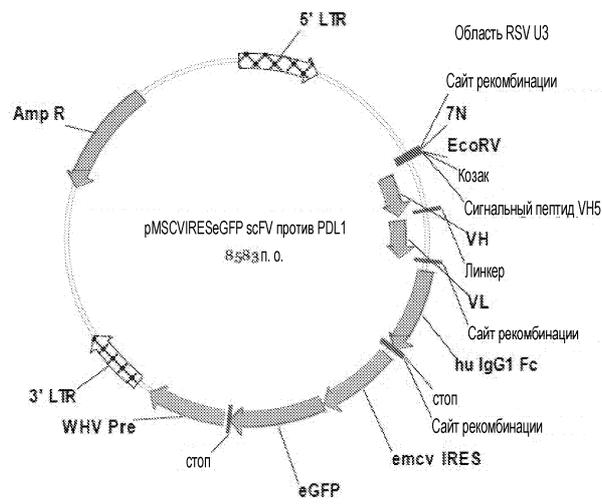
80. Способ по п.79, в котором местное введение включает внутриопухольное введение.

81. Способ по любому из пп.77-80, в котором индивидуум имеет злокачественную опухоль.

82. Способ по п.81, в котором индивидуум имеет солидную опухоль.

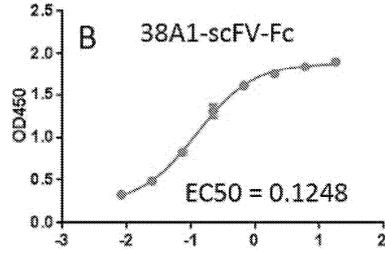
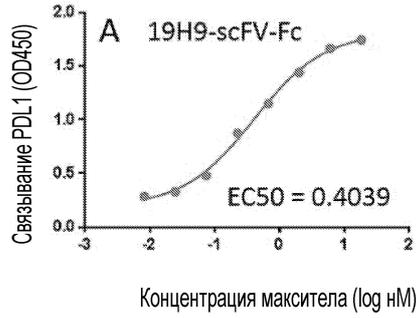


Фиг. 1

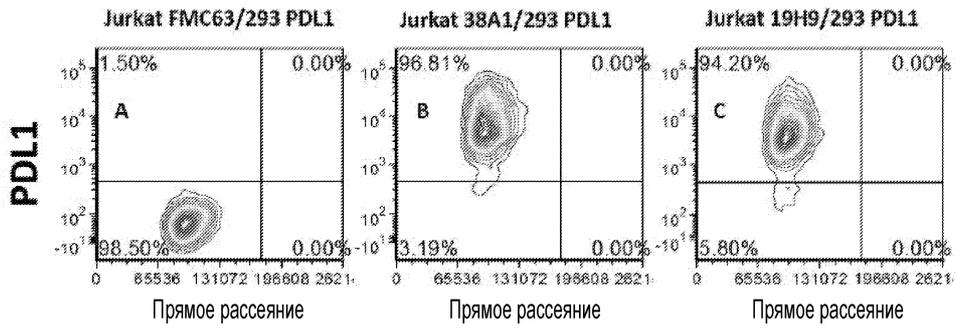


Фиг. 2

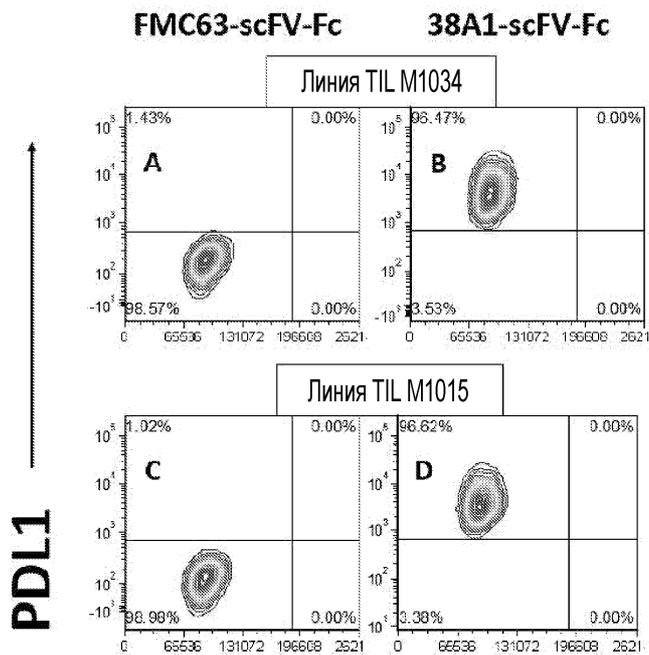
040856



Фиг. 3

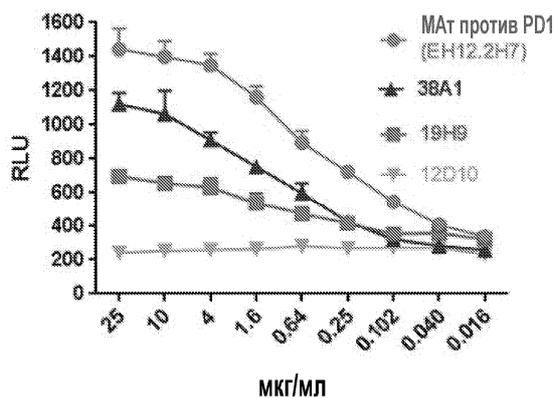


Фиг. 4



Фиг. 5

040856



Фиг. 6

Антитело 38A1

Легкая цепь

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGN**NIGRKI**VHWYQQRPGQAPVLVIY**YDT**DRPAGIPERFSGSN
SGNMATLTISTVGAGDEADYIC**QVWDTGSDHV**VFGGGTKLTVL

(SEQ ID № 1)

CDR1 (CDR-L1) : NIGRKI (SEQ ID № 2)

CDR2 (CDR-L2) : YDT (SEQ ID № 3)

CDR3 (CDR-L3) : QVWDTGSDHV (SEQ ID № 4)

Тяжелая цепь

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSNYA**MSWVRQAPGKLEWVST**ISGSGGTT**YYADSVK
GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYC**AKDWRFRSSSPDAFDI**WGQGTITVSA

(SEQ ID № 5)

CDR1 (CDR-H1) : GFTFSNYA (SEQ ID № 6)

CDR2 (CDR-H2) : ISGSGGTT (SEQ ID № 7)

CDR3 (CDR-H3) : AKDWRFRSSSPDAFDI (SEQ ID № 8)

Антитело 19H9

Легкая цепь

NFMLTQPHSVSESLGKTVTISCTGS**SGSIARKF**VQWYQQRPGSSPTTVIY**ENN**QRPSGVSDRFSG
SIGSSNSASLTISGLKTEADYIC**QSYDSSNV**VFGGGTKVTVL

(SEQ ID № 9)

CDR1 (CDR-L1) : SGSIARKF (SEQ ID № 10)

CDR2 (CDR-L2) : ENN (SEQ ID № 11)

CDR3 (CDR-L3) : QSYDSSNV (SEQ ID № 12)

Heavy Chain

QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSSYS**MNWWVRQAPGKLEWVSG**INTAGDT**HYPESVKG
RFTISRDNARNSLNMQMNSLRAEDTAVYYC**VRERVEREYSGYDAFDI**WGQGTITVSA

(SEQ ID № 13)

CDR1 (CDR-H1) : GFTFSSYS (SEQ ID № 14)

CDR2 (CDR-H2) : INTAGDT (SEQ ID № 15)

CDR3 (CDR-H3) : VRERVEREYSGYDAFDI (SEQ ID № 16)

Пример 38A1 ScFv

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISGSGGTTYADSVK
 GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCAKDWFRSSSPDAFDIWGQGT TTVTVSAGGGGGGGG
GGGGGGGAPSYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGRKIVHWYQQRPGQAPVLVIYYDTRPA
 GI PERFGSNGMATLTISTV GAGDEADYQCQVWDTGSDHVVFGGGTKLTVL
 (SEQ ID № 17)

*За тяжелой цепью 38A1 (SEQ ID № 5) следует линкер (полу жирный/подчеркнутый), за которым
 следует легкая цепь 38A1 (SEQ ID № 1).

Пример белка с 38A1 ScFv, слитым с Fc доменом (IgG1)

MGSTAILALLAVLQGVSAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLE
 WVSTISGSGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCAKDWFRSSSPDAFDI
 WGGQTTTVTVSAGGGGGGGGGGGGSGAPSYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGRKIVHWYQ
 QRPQGAPVLVIYYDTRPAGIPERFGSNGMATLTISTV GAGDEADYQCQVWDTGSDHVVFGG
 GTKLTVLGPRANFVYKSGPRPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

(SEQ ID № 18)

*За белком SEQ ID № 17 (курсивный/подчеркнутый) следует Fc домен IgG1 (полу жирный/
 подчеркнутый).

Пример 19H9 ScFv

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY SMNWVRQAPGKGLEWVSGINTAGDTHYPESVKG
 RFTISRDNARN SLNLQMNSLRAEDTAVYYCVREREREYSGYDAFDIWGQGT TTVTVSAGGGGGGGG
GGGGGGGAPNFMLTQPHSVSESLGKTVTISCTGSSGSIARKEVQWYQQRPGSSPTTVIYENNQ
 RPSGVSDRFGSGIGSSSNSASLTISGLKTEDEADYQCQSYDSSNVVFGGGTKVTVL
 (SEQ ID № 19)

*За тяжелой цепью 19H9 (SEQ ID № 13) следует линкер (полу жирный/подчеркнутый), за которым
 следует легкая цепь 19H9 (SEQ ID № 9).

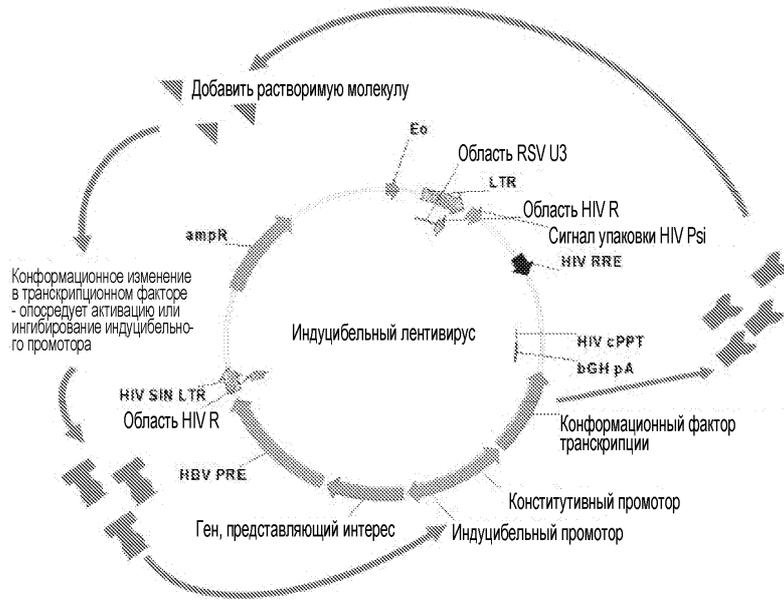
Пример белка с 19H9 ScFv, слитым с Fc доменом (IgG1)

MGSTAILALLAVLQGVSAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYS MNWVRQAPGKGLE
 WVSGINTAGDTHYPESVKGGRFTISRDNARN SLNLQMNSLRAEDTAVYYCVREREREYSGYDAFDI
 IWGGQTTTVTVSAGGGGGGGGGGGGSGAPNFMLTQPHSVSESLGKTVTISCTGSSGSIARKEVQ
 WYQQRPGSSPTTVIYENNQRPVSDRFGSGIGSSSNSASLTISGLKTEDEADYQCQSYDSSNVV
 FGGGTVTVLGPANFVYKSGPRPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

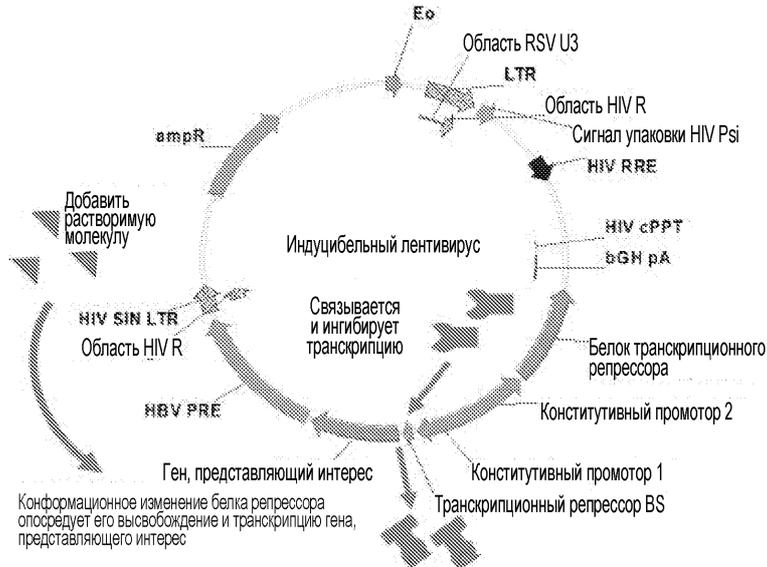
(SEQ ID № 20)

*За белком SEQ ID № 19 (курсивный/подчеркнутый) следует Fc домен IgG1 (полу жирный/
 подчеркнутый).

Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

pLV430G (Лентивирусный вектор) (SEQ ID № 35)

cgataacctaattcagatagcatatgcttcccgttggtgaacatatgctattgaattagggttagctggatagatataactactaccgggaa
gcatatgctaccggttaggggtcaccggtgatccggccacgatgctccggcgtagaggatctaattgtagttagctactcattaggcacc
ccaggctttacactttatgcttccggtcgtatgttggtaattgtgagcggatacaattcacacaggaaacagctatgacctgattac
gccaagcgcgaattaacctcactaaaggaacaaaagctggagctgcaagcttaattgtagtcttatgcaatactttagcttggcaaca
tggtaacgatgagtttagcaacatgccttacaaggagagaaaaagcaccgtgcatgccgattgggtggaagtaagggtgacgatcgtcctta
ttaggaaggcaacagacgggtctgacatggattggacgaaccactgaattgccgattgcagagatattgtatthaagtcctagctgatac
ataaacgggtcctctggttagaccagatctgagcctgggagctcctggctaactagggaaaccactgcttaagcctcaataaagcttgcctt
gagtctcaagtagtgtgctccgctctgttgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaatcttagcagt
ggcgcgcaaacagggtctgaaaagcgaagggaaccagaggagctctctcagcagcaggactcggcttctgaagcgcgacggcaaga
ggcgaaggggcggcagctggtgagtagcgaacaaattttagctagcggaggctagaaggagagagatgggtgagagcgtcagatthaag
cgggggagaaattagatcgatgggaaaaattcgggttaaggccaggggaaagaaaaatataaattaaacatatagtatgggcaagc
agggagctagaacgattcagcttaattcctggcctgttagaacaacacagaagctgtagacaaatactgggacagctacaacatccctca
gcaggatcagaagaacttagatcattatataatcacagtagcaaccctctattgtgcatcaaggatagagataaaagacacccaaggaa
gcttagacaagatagaggaagcaaaaacaaagtaagaccaccgcagcaagcggcctgatctcagacctggaggagagata
tgagggacaattggagaagtgaattatataaataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaagagaagag
tggctcagagagaaaaagagcagtgagggaataggacttcttctgggttctgggagcagcaggaaagcactatggcgcagcgtcaat
gacgctgacggtacaggccagacaattatgtctggtatagtcagcagcagaacaattgtgagggtcattgaggcgcacacagcatctgtt
gcaactcacagctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaagatacctaaaggatcaacagctcctggggattgg
ggttctctggaactcattgacaccactgctgtccttgaatgctagtggagtaataatcctggaacagattggaatcacagacct
ggatggatgggacagagaaattaacaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgaacacagcaagaaagaatgaac
aagaattattggaattagataaattgggcaagtttggtaattggttaacatacaaaattggctgtggtatataaattattcataatgatag
aggaggcttggtaggttaagaatagttttctgtacttctatagtgaaatagagttaggcagggatattcaccattatcgtttcagaccacc
tccaaccccaggggaccgacagggcccgaaggaatagaagaagaggtggagagagagacagagacagatccattcattagtgaaac
ggatctcagcggatcggttttaaaagaaaaggggggattggggggtacagtcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacat
acaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaattttatcgattttatttagtctccagaaaaaggggggaaatgaaagcccc
acctgtaggttggcaagctagcttaagtaacgccattttgcaaggcatggaaaatacataactgagaatagagaagttcagatcaagggtta
ggaacagagagacagcagaatattggccaacaggatattctgtgtaagcagttcctccccggctcagggccaagaacagatggtcccc
agatcggtccccccctcagcagttctagagaacatcagatgttccagggtgcccccaaggacctgaaatgacctgtgcttatttgaact
aaccaatcagttcgttctcgttctgttgcgcgcttctctccccagctcaataaaagagcccacaacccctcactcggcgcgcccagctct
ccgatagactgctgcccgggtaccgatatacaagtttgtaaaaaagctgaacgagaacgtaaaatgatataaataatcaatataatta
aattagattttgcataaaaaacagactacataactgtaaaaacacaacataatccagtcactatggcggccgattaggcaccggccttca
cactttatctccggctcgtataatgtgtgattttgagttaggatccgtcgagattttcaggagctaaggaagctaaaatgggagaaaaaac
cactggatataaccagcttgatataccaatggcatcgtaaagaacattttgaggcatttcagtcagttgtcaatgtactataaccagacc
gttcagctggatattcggccttttaagaccgttaaagaaaaataagcacaagttttatccggcctttattcacattcttcccgcctgatgaa
tgctcatccggaattccgatggcaatgaaagacggtagctggtgatgggatagttacccttgttacaccgttttccatgagaaact
gaaacgttttcatcgtctggagtgaaataccacgacgatttccggcagtttctacacataatccgaagatgtggcgtttacgggtgaaacc
tggcctatttccctaaagggttattgagaatagttttctcagcacaatccctgggtgagtttaccagttttgattaaacgtggcaaatat
ggacaactcttcccccttttaccatgggcaaatattatacgaaggcgaacaggtgctgatgcccgtggcagattcaggttcatcatgccc
gtttgtgatggctccatgtcggcagaatgcttaataatcaacagtagctcagatgagtgaggcagggcggggcgtaaacgctggatccgg
cttactaaaagccagataacagtagctatttgcgcgctgattttgcggataagaatatactgatagtataaccgaaatgtcaaaa
agaggtatgctatgaagcagctattacagtgacagtgacagcagcagctatcagttgctcaaggcatatagatgcaatctccggctt
ggtaagcacaacctcagaatgaagcccgtcgtcgtcggcaacgctggaaagcggaaaatcaggaaggatggctgaggtcggccc
gtttattgaaatgaacggcttttctgacgagaacaggggctggtgaaatgagtttaaggtttacacctataaaagagagagccgttacc
gtctgtttggatgtacagagtgatatttgacacgcccgggacggatgggtgatccccctggccagtgacgtctgctgacataaagt

ctcccgtgaactttaccgggtgtgcatatcggggatgaaagctggcgcatgatgaccaccgatggccagtggtccggctccggtatcgg
 ggaagaagtggtgatctcagccaccgcaaaatgacatacaaaacgccattaacctgatgttctggggaatataaatgtcaggctccctta
 tacacagccagctcgcaggctgaccatagtgactggatgttgtgtttacagatattatgtagtctgtttttatgcaaaaatcaattatataat
 tgatattatatacttttaccgtttctggtcagctttctgtacaagtgggtgattcagagtaattaagctagcctagtgccattgttcagtggttc
 gtagggctttccccactgtttggctttagttatagtgatgtggtattgggggccaagtctgtacagcatctgagtcctttttaccgctgt
 taccaattttctttgtctttgggtatacatttaaacctaacaacaaagagatgggggtactctctaaattttatgggtatgtcattggatgt
 tatgggtccttgccacaagaacacatcatacaaaaaatcaagaatgttttagaaaacttcttataacagccctattgattggaaagtatgt
 caacgaattgtgggtctttgggtttgtctgcccctttacacaatgtggtatctctgcttgatgacctttgtatgcatgtattcaatcaagcagg
 ctttactttctgccaacttacaaggcctttctgtgtaaacatacctgaacctttaccctgttcccggcaacggccaggtctgtccaagtg
 ttgtctgacgcaacccccactggctggggcttggcatgggcatcagcgcagctggaaccttttggctcctctgcccagatccatactgccc
 aactcctagccgctgtttgtctgcagcaggtctggagcaaacattatcgggactgataactctgttctctatcccgcaaatatacatcgttt
 ccatggctgtaggctgtgctccaactggatcctgcgaggacgtcctttgttctcccgtcggcgctgaactcctgcggacacccctctcg
 gggtccttgggactcctctcccctctcctgctgctgctccgaccgaccacggggcgcacctctctttacgaggactccccctgtgcttc
 tcatctgcccggaccgtgctcacttgcctcctcagctgcagctcagtgagaccaccgtgaaccccacaaatattgccaaggctttacata
 agaggactctggactctcagcaatgtcaacgaccaccttgaggcactcaaaagactgtttgttaagactggaggaggtgggggag
 gagattaggttaaaggctttgactaggaggctgtagcataaattggctgcgcaccagcacatggcgcaatcactagagcgggtacct
 ttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccacttttaaaagaaaagggggactggaaggctaatcactccaacgaag
 acaagatctgcttttctgtactgggtctctggttagaccagatctgagcctgggagctcttggctaaactagggaaaccactgcttaagc
 ctcaataaagcttgccttgagtgctcaagtagtgtgctcccgtctgtgtgactctgtaactagagatccctcagacccttttagtcaggt
 ggaaaatcctagcagtagtagttcatcttattatcagatattataactgcaaaagaaatgaatcagagagtgagaggaaactgtt
 tattgagctataatggttacaataaagcaatagcatcaaaaatcacaataaagcattttttcactgacttagttgtggtttgtccaa
 actcatcaatgatcttcatgctggtctagctatcccggcccaactcctccatcccggcccaactcggccaggttccggccattctccg
 ccccatggctgactaattttttatattatgagaggcggaggccgatccctgagtggtttcatctcgggagcagactttgagctgtggact
 gcaacaacactgctttatgttaactctggtggaactcttaccaatgctgggggacatgactcccaggggccagggaagactac
 gggaggctacaccaacgtcaatcagaggggcctgtgtagctaccgataagcggaccctcaagagggcatgcaataggtttataaggcc
 ccctgttaattctgaagcgaaggccctgtagacgctattttataggttaatgcatgataataatggtttcttagacgtcaggtggc
 actttcggggaaatgtgcggaacccctattgtttatttttaaaatcaatcaaatatgtagtccgctcagagacaataaccctgataaat
 gcttcaataatgaaaaaggaagatgtagtattcaacattcctgtgcgcttattcctttttgcgccattttgcttctgttttctgct
 acccagaaaagctgtgaaagtaaaagatgtgaagatcagttgggtgcagagtggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagat
 ccttgagagtttcccccgaagaacgttttcaatgatgagcacttttaaagtctgctatgtggcgcggtattatcccgtgtgacgcccggc
 aagagcaactggctcgcgcatatacactattctcagaatgactgtgtagtactcaccagtcacagaaaagcattctacggatggcatgaca
 gtaagagaattatgagctgctccaataaccatgagtgataaacactgcccgaacttactctgacaacgacgaggagaccgaaggagctaa
 ccgctttttgacaacatgggggatcatgtaactcctgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaacagcagcgtgac
 accacgatgctcagcaatggcaacaactgctgcaaaactataactggcgaactactactctagcttcccggcaacaatataagactgg
 atggaggcggataaagttgcaggaccacttctgctgccccttccggctggctgtttattgctgataaatcggagcgggtgagcgtggg
 tctcgggtatcattgagcactggggccagatggttaagcctcccgtatcgtagttatctacagcggggagtcaggcaactatggatgaa
 cgaatagacagatcgtgagataggtgctcactgattaagcattggttaactgtcagaccaagttactcatatatacttttagattgattaa
 aacttcatttttaattaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgt
 cagacccttagaaaagatcaaggatcttctgagatcctttttctgctgtaactctgctgtgcaacaaaaaaaccaccgtaccag
 cgggtgtttgttccggatcaagagctaccaactctttccgaaggtaactgctcagcagagcgcagataccaaatctgtccttctagt
 gtagccgtagttaggccaccactcaagaactctgtagaccgctacatacctcgtctgtaactcctgttaccagtggtctgctgagcagtg
 gataagtcgttcttaccgggtggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcgtgctgggctaacggggggtctgtcacacagcc
 cagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatcctacagcgtgagcattgagaaaagcgaacgcttcccgaagggagaaggcggga
 caggatccggttaagcggcagggtcggaaacaggagagcgcagaggagcttccagggggaaacgctggtatctttatagctcgtcggg
 tttcaccactctgactgagcgtcattttgtgatgctcgtcagggggcgaggcctatggaaaaacccagcaacgcccgtttttacggt
 tctggccttttctgctccttttgaagctgtccctgatggtcgtcatctacctgctggacagatggcctgcaacgcccggatcccagatccc
 ccggaagcgaagaatcataatggggaaggccatccagcctcgcgtc

Фиг. 10А

pCIGO-VSV.G (VSVG) (SEQ ID № 36)

gtcgacggatcgggagatcaattccggcacctgtcctacgagttgcatgataaagaagacagtcataagtcggcgacgatagtcatgcccc
 gcgccaccggaaggagctgactgggtgaaggctcaaggcatcggctgatgcaggaaaaggacaagcagcgaataacgcccc
 ttgggagggtggcggcatatgcaaggatagcactcccactctactctgggtatcatatgctgactgtatgcatgaggatagcatatgcta
 cccggatacagattaggatagcatatactaccagatagattaggatagcatatgctaccagatagattaggatagcctatgctacc
 agatataaattaggatagcatatactaccagatagattaggatagcatatgctaccagatagattaggatagcctatgctaccaga
 tatagattaggatagcatatgctaccagatagattaggatagcatatgctaccagatagattaggatagcctatgctaccagata
 aataggatagcatatactaccctaatctctataggatagcatatgctaccggatacagattaggatagcatatactaccagatagattagg
 atagcatatgctaccagatagattaggatagcctatgctaccagatataaattaggatagcatatactaccagatagattaggata
 gcatatgctaccagatagattaggatagcctatgctaccagatagattaggatagcatatgctaccagatagattaggatagcctatgct
 taccatggcaacattagcccactgctctcagcgacctcgtgaatagaggaccaacaacctgtgcttggcgtcaggcgcaagtgtgtg
 taatttgcctccagatcgcagcaatcgcgccctatctggcccgccactctatgcaggattccccggggtgccattagtggtttgtgg
 gcaagtgtttgaccgagtggttagcgggttacaatcagccaagttatacaccctattttacagtccaaaaccgagggcggtgtgg
 gggctgacgctgccccactccacaattcaaaaaaagagtgccactgtctttttatgggccccattggcgtggagccccgttaatt
 ttgggggtgttagagacaaccagtggtcgcgtctgtcggcgtccactctcttccccctgttcaaaatagagtgtaacaacatggtcac
 ctgtcttggcctcctgggacacatcttaaacccagatcatattgcaactaggtattgttggccatagccataaattcgtgtgagat
 ggacatccagctcttacgcttgcctccaccatggatttctattgttaaatgattcagaatgtttcattcctacacagtagtatttggccaa
 ggggtttgtgaggttatattggtgcatagcacaatgccaccactgaacccccgtccaaatttattctggggcgctcacctgaaacctgtt
 ttgagcacctcacatacacttactgttcaactcagcagttattctatagctaaacgaaggagaatgaagaagcagggcgaagattcag
 gaggttactgcccgtccttgatcttcagcactccctgtgactaaaattggtcactaccctcgtggaatcctgacccatgtaaaaa
 accgtgacagctcatggggggagatcgtgttcttagaccctttactaacctaattcgatagcatatgctccccgttgggtaacata
 tctattgaattagggttagctgtagtatatactactaccgggaagcatatgctaccggttagggtaacaagggggccttataaacac
 tattgctaattgcctctgaggggtcgttatcggtagctacacagggccctcgtattgacgttgggtgtagcctcccgtagcttctcgtggccct
 gggaggtacatgtccccagcattgggtgaagagctcagccaagagttacacataaaggcaatgttgggtgtagtccacagactgcaaa
 gctgctccaggatgaaagccactcaagggtcttcaatattggcattagccatatttattcattggttatatagcataaataatattggcatt
 ggccattgcatactgttatcataataatgtacattatattggctcatgtccaatagaccgcatgtggcattgatttactagttat
 ttaatagtaataacacggggtcatttagttcatagccatataatggagttccgcttacataaactacggtaaatggcccctgctgaccg
 ccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgtcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagatt
 tacggtaaactgccacttggcagtcacatcaagtgtatcatatgccaagtccgcccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccctggtc
 attatgccagtcacatgaccttacgggacttctacttggcagtcacatctacgtattagtcacgtctattaccatgggtgatcggtttggcag
 taccacaaatggcggtgtagcgtttgactcacgggatttccaagtcacccccattgacgtcaatgggagttgtttggcaccacaaatca
 acgggactttccaaaatgctgaataaccccccccgttgacgcaaatggcggtaggcgtgtagggggaggtctatataagcagagctc
 gtttagtaaccgtcagatcactagaagctttattgcggtatttatcacagttaaattgctaacgcagtcagcttctgacacaaactcctg
 aacttaagctgcagaagtgtgctgtaggactgggaggtatcaaggttacaagacaggtttaaaggagaccaatagaaactgggct
 tgcgagacagagaagactcttgcgtttctgtaggacactattggcttactgacatccactttgccttctccacaggtgtccactcccag
 tcaattacagctttaaaggctagagtaactaacgactcactataggctagcggtagcagctcggatccactagtaacggccgctggtg
 ctggaattcaacagagatcgtatcttcttgcactatgaagtgcctttgtacttagccttttattcattggggtgaattgcaagttcacct
 agttttccacacacacaaaaggaaactggaaaaatgttcttcaattaccattattgcccgtcaagctcagattaaattggcataatgac
 ttaataggcacaccatacaagtaaaatgcccaagagtcacaaggctattcaagcagcgggtggatgtgcatgcttcaaatgggtcac
 tactgtgatttccgctgtaggacccaaggtataaacacagtcacatccgcttctcactccatctgtagaacaatgcaaggaaagcattgaa
 caaacgaaacaaggaaactggctgaatccaggtctccctcctcaaggttggtgatgcaactgtgacggatgccgaagcagtgattgtcca
 ggtgactctccatgtgctggtgatgaatacacaggagaatgggttgattcacagttcatcaacggaaaatgcagcaattacatagccc
 cactgtccataactctacaacctggcattctgactataaggtcaagggtatgtgattcaacctatttccatggacatcaccttctctcag

PLV4301G38A1 (ТАКЖЕ ОБОЗНАЧАЮТ КАК pLV4301G PDLV scFV 38A1) (SEQ ID № 37)

cgataaccctaattcgatagcatatgcttcccgttgggtaacatatgctattgaattagggttagctggatagatataactactaccgggaa
gcatatgctaccggttagggttaccggtgatgccggccacgatcgctccggcgtagaggatctaattgtagttagctcactcattaggccac
ccaggctttacactttatgcttccggctcgatgttggtaattgtgagcggataacaattcacacaggaacagctatgaccatgattac
gccaaagcgcgaattaaccctcactaaagggaacaaaagctggagctgcaagcttaattgtagctttatgcaataactctttagtcttgaaca
tggtaacgatgagtagcaacatgccttacaaggagagaaaaagcaccgtgcatgccgattggggaagtaagggtgacgatcgctcctta
ttaggaaggcaacagcgggtctgacatggattggcgaaccctgaattgccgattgcagagatattgtatttaagtcctagctcgatc
ataaacgggtctctctggtagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaaccactgcttaagcctcaataaagcttgcctt
gagtgctcaagtagtggtcccgtctgtgtgactctggaactagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagt
ggcggccgaacagggactgaaagcgaagggaaccagaggagctctcgcacgaggactcggcttgcgaagcgcacggcaaga
ggcggggggcggcactggtgagtagcgaataattgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgagagcgtcagatattaag
cgggggagaattagatcgatgggaaaaaattcggtaaggccgggggaaagaaaaataaaataaaacatatagtagggcaagc
aggagctagaacgattcgcagttatctggcctttagaacaatcagaaggcttagacaaatactgggacagctacaacctccctca
gacagatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaggatagagataaaagacccaaggaa
gctttagacaagatagaggaaagcaaaacaaaagttagaccaccgacagcaagcggcctgatcttcagacctggaggaggagata
tgagggacaattggagaagtgaattataataataaagtagtaaaattgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaagagaagag
tggtgagagagaaaaagagcagtggaataggagcttcttcttgggtcttgggagcagcaggaaagcactatgggcgacgctcaat
gacgctgacggtacaggccagacaattattgtctgtatagtcagcagcagaacaattgtgagggtattgaggcgaacagcatctgtt
gcaactcacagcttggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaagatacctaaaggatcaacagctcctgggatttgg
ggtgctctggaaaactattgaccactgctgtgcttggatgctagttggagtaataaatctctggaacagatttggatcacacgacct
ggatggagtgaggacagagaataaacaattacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgaaaaccagcaagaaagaatgaac
aagaattattggaattagataaatggcaagtttggaaattggttaacatacaaaattggctgtgataaaaattattcataatgatag
aggaggtctgtaggttaagaatggttttctgtactttctatagtgaaatagagttaggcaggatattcaccattatcgtttcagaccacc
tccaaccccgaggggaccgacagggcccgaaggaaatagaagaagaaggtggagagagacagagacagatccattcagattagtgaa
ggatctcgacggtatcggttttaaaagaaaagggggattggggggtacagtgcaagggaaagaatagtagacataatagcaacagacat
acaaactaaagaattacaaaaacaattacaaaattcaaaatttatcgatttttagtctccagaaaaaggggggaatgaaagacccc
acctgtaggttggcaagctagcttaagtaaccatttgcaggatggaaaatacataactgagaatagagaagttagatcaagggtta
ggaacagagagacagcagaataggccaacaggatctgtggtgaaagcagttcctgccccggctcaggggccaagaacagatgggtccc
agatgagggtcccgcctcagcagttcttagaaccatcagatgttccagggtgccccaggacctgaaatgacctgtgcttatttgaact
aaccaatcagttcgtctcgtctgttgcgcttctgctccccgagctcaataaaagagcccaaacccctcactcggcgcgacctct
ccgatagactgctgccccgggtaccgatcaccaacttgtacaaaaagctgaacgatatcgccacatgggcagcacagccattctgg
ccctgctgctgagcagtgctgagggcgtgtcagctGaagtgcagctggtggaatctggcggcggactggtgacgctggcgatctcgaga
ctgagctgtgcccgagcggcttccctcagcaactacgcatagctggaaggccggttcacatctccgggacaacagcaagaacacctgtac
catcagcggctctggggaaccactactacgcatagcgtgaaaggccggttcacatctccgggacaacagcaagaacacctgtac
ctgagatgaacagcctgagggtggaagataccgctgtactactgccaaggactggttcagaagcagcagccccagccttcgaca
tctggggccagggaacaaccgtgaccgtctgctgctggcggaggcggatcaggcggcggaggatcagggggaggcgaagcggagcacctt
cttacgtgtagccagccccctagcgtgtcagtgctcctggacagaccgagaatcacctgtggcggcaacaacatcgccgggaagatc
gtgactggtatcagcagaggccggacaggctcccgtgctgctgactactacgacaccgacagacctgcccgatccccagagagattcag
cggcagcaacagcggcaacatggccaccctgacctcagcagctgggagccggcagcagggcactactactgtcaagtggtggacac
cggcagcagatcagtggttggaggcggcaaacgctgacagtgctggcccggcggccaactttgtatacaaaagttagcagagagc
aagtacggccctcctgccccctgccccgagttctggcggaccagcgtgttctgttcccccaagcccaaggacacctgga
tgatcagccggacccccagggtgacctgtgtggtggtagctgtccagaggacccccagggtccagttcaactggtacgtggacggcgtg
gaggtgcacaacccaagaccaagccccggggaggagcagttcaatagcacctaccgggtggtcctgctgacctgctgcaccaggact

ggctgaacggcaaggaataacaagtgaaggtgtccaacaaggcctgccagcagcatcgagaaaaccatcagcaaggccaaggccag
 cctcgaggagccccaggtgtacacccctgccccctagccaagaggagatgaccaagaatcaggtgtccctgacctgctggtgaagggcttcta
 cccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaacggccagcccagagaacaactacaagaccacccccctgtgctggacagcgacggcag
 ctcttctgtacagcaggctgacctggacaagaccgggtggcaggaggcaactcttttagctgctccgtgatcagcagggcctgcaca
 accactacaccagaagagcctgtccctggagcctggcaagatgttcagatcttgtgatattatcatctgggaccccttggcggcaatctgct
 ggcccttctgctgcttcatcatctctcatctgtactcaccagcggctccggcaagcccggctctggcggaggctccaccagcggc
 gactacaaggacgacgatgacaagtaatagatatcggttcagcttctgtacaagttgggattcaggttaattaagtaacgaattcccc
 ccctctccccccccctactgctggcgaagccgcttgggaataaggccggtgtgcttgtctatatttccaccatattgccc
 tctttggcaatgtgagggcccggaaacctggccctgtctcttgacgagcattcctaggggctttccccctcgcgcaaggaatgcaaggtct
 gttgaatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaagcttctgaagacaacaactctgtagcagcccttgcaggcagcggaacccccac
 ctggcgacaggtgctctcggccaaaagccacgtgataagatacacctgcaaggcgcaacccccagtgccacgttgtagttggata
 gttgtgaaagagtaaaatggctctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgccagaaggtaccaccattgtatgggatctgatctg
 gggcctcgggtgacatctttacatgtgtttagtcgaggttaaaaaactctaggccccccgaaccaggggacgtggttttctttgaaaaac
 acgatgataatagggcacaaccatgggagggcgaagcggcggaggctccccctcaggcaccatgggtgagcaaggcgaggagctgttca
 ccgggggtggtcccactcgtgagctggacggcagctaaacggccaagaagttcagcgtgctggcgagggcgaggcgatgccacctta
 cggcaagctgacctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgccctgcccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgagtg
 cttcagccgctaccccaccacatgaagcagcagcacttctcaagtcgcatgccgaaggctacgtccaggagcgaccacatcttctcaa
 ggacgacggcaactacaagaccgcccggaggtaagttcagggcgacaccctgggaaccgcatcgagctgaagggcagcactcaaa
 ggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccaacaactctatatcatggcgacaagcagaagaacggcat
 caagtgaaactcaagatccgcaacaatcaggacggcagcgtgagcctcggaccactaccagcagaacccccatccggcagcgg
 cccctgctgctcccgaacactactgagcaccagctccctcagcaagacccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctgg
 agttcgtgaccgcccgggatcactctcggcatggacgagctgtacaagtaacgctcccgggtctagagctagcggtagcattacgt
 agtcgacgactaataagctagcctagtcctattgttcagtggttcgtagggtttccccactgtttggctttagttatagatgagtg
 tattggggcacaagctgtacagcatctgagtccttttaccgctgttaacattttctttgtcttgggtatacattaaacctacaacaaac
 aaagagatggggtaactctctaaatattatgggttatgcttgatggttatgggtccttgcacaagaacacatcatacaaaaaatcaaga
 atgttttagaaaactctattaaacaggcctattgattgaaagtatgtcaacgaattgtgggtcttttgggttttctgcccctttacacaatgt
 ggtatcctgctgtgatcctttgatgatgtattcaactaagcaggcttctcctcgcacaactacaaggccttctgtgtaacaatacc
 tgaacctttaccctgtcccggcaacggcaggtctgtgccaagtttctgacgcaacccccactggctggggcttggctcatggccatca
 cgcatgctgggaacctttcggctcctcgcgatacactgcccgaactcctagccgctgttttctcgcagcaggtctggagcaaaatta
 tcgggactgataactctgttctatcccgaataatacatcgtttccatggctgtaggctgtgctgccaactggatcctcggcggagcgtcc
 tttgttacgtcccgtcggcgtgaatcctcgggacgaccttctcgggctgcttggactctctcgtccccttctcgtcctgctccgttccgaccg
 accacggggcgcacctctctttacgggactccccgtctgtgcttctcactcgcggaccgtgtgacttgccttaccctcgtcagctgcatg
 gagaccctgtaacgccaccaaataattcccaaggtcttacaagaaggactcttggactctcagcaatgtcaacgaccgaccttgaggc
 atactcaagactgtttgttaagactgggaggagttggggaggagattaggttaaaggctttgtactaggaggctgtaggcataaatt
 ggtctgcgaccagcaccatggcgcaatcactagagcgggtacctttaaagaccaatgacttaaggcagctgtagatcttagccactttt
 aaaaagaaaagggggactggaaggctaattcactccaacgaagacaagatctgcttttctgtactgggtctctcgtgttagaccagat
 ctgagcctgggagctctggttaactagggaaccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgcttcaagtagtgtgtcccctctg
 ttgtgtactctggaactagagatcccctcagacccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagtagtagttcatcttattattcagtat
 ttataactgcaaaagaatgaatcagagagtgagaggaaactgtttattgacgttataatggttacaataaagcaatgatcacaat
 ttcaaaataaagcatttttctcactgacttagttgtggtttgtccaaactcatcaatgatactatcatgtctggctctagctatccccct
 aactccgccatcccgcctaaactccgccagttccgccattcggccccatggctgactaatttttttattatgagagggcggagccg
 gatccctgagtggttctcctggagcagactttcagctgtggactgcaacacaacattgctttatgttaactcttggctgaagctctta

caccaatgctggggacatgtacctcccaggggcccaggaagactacgggaggctacaccaacgtcaatcagagggcctgtgtagctacc
 gataagcggaccctcaagaggcattagcaatagtttataaggcccctgttaattctgaagacgaaaggcctcgtgatacgctatt
 ttataggttaatgtcatgataataatggttcttagacgtcaggtggcacttttcgggaaatgtcgcggaaccctattgttttttctaa
 atacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgtctcaataatggaaaaaggaagagtatgagattcaacattc
 cgtgtcgccttattccctttttgaggcattttgcttctgtttttgctcaccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttg
 ggtgacagagtggttacatcgaactggatcacaacgaggaagatccttgagagtttcgccccgaagaacgtttccaatgatgagcact
 ttaaagttctgctatgtggcggtattatccgtgttgacgcccggcaagagcaactcggctcggcatacactattctcagaatgacttg
 ttgagtactaccagtcacagaaaagcattacggatggcatgacagtaagagaattatgagtgctgccaataacctgagtgataaact
 gcggccaacttactctgacaacgatcggaggaccgaaggagtaaccgtttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgt
 tgggaaccggagctgaatgaagccatacacaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgcagcaatggcaacaacgttcgcaaacattat
 actggcgaactcttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaaagttgagggaccactctcgtcggccctt
 ccgctggctggtttattgctgataaatctggaccggtagcgtgggtctcgcggtatcattgagcactggggccagatgtaagccctcc
 cgtatcgtagtattctacacgaggggagtcaggcaactatggatgaacgaatagacagatcgtgagataggctcctcactgatgaagca
 ttgtaactgtcagaccaagtttactcatatatacttttagattgatttaaaactcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatcctttgat
 aatctcatgacaaaatccctaacgtgagtttcttccactgagcgtcagaccctgagaaaagatcaaggatcttcttgatccttttt
 tctcgcgtaatctgctgcttgcacaacaaaaaacaccgctaccagcgggtgtttgttccggatcaagactaccaactcttttccgaag
 gtaactggcttcagcagagcgcagatacacaatactgtccttctagtgtagcgttagttagccaccactcaagaactctgtagaccgct
 acatacctcgtctgtaatcctgttaccagtggtcgtgaccagtgagataagtcgtcttaccgggttgactcaagacgatagtaccgg
 ataagcgcagcggcggctgaacggggggtcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagc
 gtgagcattgagaaagcaccgcttcccgaaggagaaaggcggacaggtatccgtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcagc
 agggagcttccaggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggttcgcccactctgacttgagcgtcattttgtgatcctcagg
 gggcggagcctatgaaaaacccagcaacgccccttttacggttctgccccttttctggccttttgaagctgtccctgatggtcgtcat
 ctacctcctggacagcatggcctcaacgcccgcctcccgatccgcccgaagcagagaagaatcataatggggaaggccatccagcctc
 cgtcg

Фиг. 11А

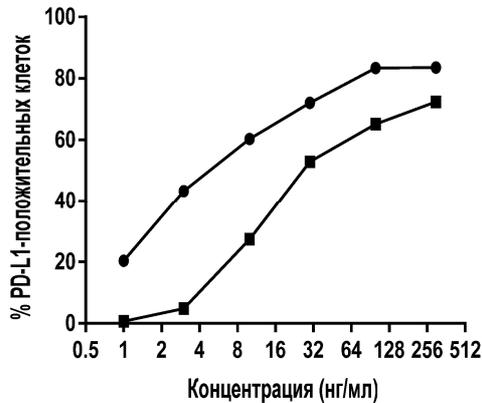
gaggtgcacaacgccaagaccaagccccgggaggagcagttcaatagcacctaccgggtggtgctcgtgctgacccgtgctgaccaggact
 ggctgaacggcaaggaatacaagtgaagggtgccaacaaggccctgcccagcagcatcgagaaaaccatcagcaaggccaaggccag
 cctcgggagccccagggtgtaaccctgccccctagccaagaggagatgaccaagaatcagggtgctcctgacccctgctgtaagggtctta
 cccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaacggccagcccagagaacaactacaagaccacccccctgctgagcagcgacggcag
 cttctcctgtacagcaggctgaccgtggacaagaccgggtggcaggaggcaacgtcttttagctgctcctgatgacagggcctgcaca
 accactacaccagaagagcctgtccctggagcctggcaagatgttcagatctttgatatttacatctgggcaacccctggccgaatctgct
 ggccctctgctgctctgatcatctcatctgctacggctccaccagcggctccggcaagcccggctctggcgagggtccaccagcggc
 gactacaaggacgacgatgacaagtaataggatctcgttctctgtacaagttgggattcgagtttaagtttaagcaattcccc
 ccctctccccccccctaaactgactggcgaagcgttggaaataaggccggtgctgtttgtctatatgttatttccacatattgccc
 tctttggcaatgtgagggcccgaaacctggccctgtctcttgacgagcattcctaggggtcttccccctcgcgaaggaaatcaaggct
 gttgaaatgctgaaggaaagcagttcctctggaagcttctggaagcaaacacgtctgtagcagcccttgaggcagcggaaacccccac
 ctggcgacaggtgctctgcccgaagcagctgataagatacacctgcaaggcggaacccccagtgccactgtgagttgagttggata
 gttgtggaaagagtcaaatggctctcctcaagcgtattcaacaagggtggaaggatgccagaaggtacccattgtatgggatctgatctg
 gggcctcgggtcacatgctttacatgttttagtgggttaaaaaacgtctaggcccccaaccacggggagctggtttctttgaaaaac
 acgatgataatagccacaacatgggaggcggaagcggcgaggctcccctgaggcaccatggtgagcaaggcgaggagctgttca
 ccgggggtggtccctcctgctgagctggacggcgagctaaacggccaagaattcagcgtgctggcgaggggcgaggcgatgccaccta
 cggcaagctgacctgaagtcatctgaccaccggcaagctgcccgtccctggcccaccctgtagccaccctgacctacggcgtgagtg
 cttcagccgctacccccaccacatgaagcagcagcactctcaagtccgcatcccgaaggctacgtccaggagcgaccatcttctcaa
 ggacgacggcaactacaagaccgcccggaggtgaagttcgaggcgacacccctggtgaaccgcatcagctgaagggtcagcttcaa
 ggaggacggcaactcctgggcaagaagtgagtaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggcat
 caaggtgaactcaagatccgcaacaacatcgaggacggcagcgtgtagctgcccagcactaccagcagaacccccctcggcgacgg
 ccccgctgctgcccgaacactacctgagcaccagctccctgagcaagacccaacgagaagcgcgatcacatggctcctgctgg
 agttcgtgaccgcccgggatcactctcggcatggacgagcgtgacaagtaacgctcccgggtctagagctagcggtaccatgattacgt
 agtcgacgacttaataagctagcctagtcacattgttcagttgctgtagggcttccccactgtttggcttcagttatatggatgatggtg
 tattggggccaagtctgtacagatctgagtcctttttaccgctgttaacaaatcttttcttcttgggtatacatttaaacctcaaaaaac
 aaagatggggttactctcaaatattatgggttatgctattggtgcttggccaagaacacatcacaataaaacaaaga
 atgttttagaaaactctattaaacggcctattgattgaaagtagtcaacgaattgtgggtcttttgggtttgctgcccttttacaaatgt
 ggtatcctgctgtagcctttgtatgcatgtattcaactaagcaggcttccactttctcccaactacaaggccttctgtgtaaaataacc
 tgaacctttaccctgtcccggcaacggccaggctctgtgccaagttgtgtagcgaacccccactggctggggttggctatgggcatca
 cgcgatgctggaaccttttggctcctctgcccagatcactgagcaactcctagccgctgttttctgtagcagcaggtctggagcaaacatta
 tcgggactgataactctgttctatcccgaataatcatcgtttccatggctgtaggctgtgctgccaactggatcctgcccgggagctcc
 tttgttacctcccctggcgtgaaatcctcgggacgacctctcggggtcgttgggactctctgcccctctcctgctcctcctgacgg
 accacggggcgaccctctttacgggactccccgtctgtccttctcatctgcccggaccgtgcaactcctcaccctcgcacgtcgcagc
 gagaccacgtgaacgccaccaaattgccaaggtcttacaagaaggactctggactctcagcaatgtcaacgaccgacctgaggc
 atactcaagactgtttgttaagactgggaggttggggaggagattaggttaaggctcttgtactaggaggctgtaggcataaatt
 ggtctgcccaccagcaccatggcgcaatcactagagcggggtaccttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccatttt
 aaaagaaaagggggactggaagggttaattcactcccaacgaagacaagatctgcttttctgtagggtctctctggttagaccagat
 ctgagcctgggagctctggtactagggaacccactgcttaagcctcaataaagctgcttggagtgcttcaagtagtgtgctgcccgtctg
 ttgtgtagctggttaactagagatcccctagacccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagtagtagttcatgctattattcagtat
 ttataactgcaagaaatgaatatcagagagtgagaggaactgtttattgagcttataatggttaaaataaagcaatagcatcaaaat
 ttcacaataaagcatttttactgactttagttggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgctggtctagctatccccct
 aactccgcccctcccgcctaaactccgcccagttccgcccattcggcccctagggctgactaattttttatttatgagagggcggagccg
 gatccctgagtgcttcatcctggagcagacttgcagctgtggactgcaacacaacattgcctttatgtgtaactcttggctgaagctctta

caccaatgctggggacatgtacctcccaggggccaggaagactacgggaggctaccaactcaatcagaggggcctgtgtactacc
 gataagcggaccctcaagagggcattagcaatagtgttataagggcccttgaattctgaagacgaagggcctctgatacgcctatt
 tttatagttaatgtcatgataataatggtttctagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtcgcggaaccctatttgttttttctaa
 atacattcaaatagtatccgctcatgagacaataaacctgataaatgctcaataatgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttc
 cgtgtcgccttattccctttttgctggcattttgcttctgttttgctcaccagaaaacgctggtgaaagtaaaagatgtgaaatcagttg
 ggtgacagagtgggttacatcgaactggatctcaacagcgtaagatccttgagagttttcggcccaagaacgttttccaatgatgagcact
 ttaaaagttctgtatgtggcgcggtattatcccgtgttgacgcccgggcaagagcaactcggctcgcgcatacactattctcagaatgactgg
 ttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcatgtctccataaccatgagtataacact
 gggccaacttactctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaacccgtttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgt
 tgggaaccggagctgaatgaagccataccaacgacgagcgtgacaccacgatcctgcagcaatggcaacaacgttgccaaactatta
 actggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaaagttgcaggaccacttctgctcggccctt
 ccggctggctggtttattgctgataaactcggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggttaagccctc
 cgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaaacgaaatagacagatcgtgagataggtgctcactgattaaagca
 ttgtaactgtcagaccaagtttactatataactttagattgatttaaaactcatttttaatttaaaagatctaggtaagatccttttgat
 aatctcatgacaaaatcccttaactgagttttcgttccactgagcgtcagacccttagaaaagatcaaaaggatcttctgagatccttttt
 tctgctgtaatctgctgcttgcacaacaaaaaacccgctaccagcggtggtttgttgcggatcaagagctaccaactcttttccgaag
 gtaactggctcagcagagcgcagataccaataactgtccttctagtgtagcctgtagttagccaccactcaagaactctgtagcaccgct
 acatacctcgtctgtaactcgttaccagtggtgctgacagtgccagtgccgataagctgcttaccgggttgactcaagacgatgtaccgg
 ataaggcgcagcggctggaacgggggtctgtcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagc
 gtgagcattgagaaagcaccgcttccgaaggagaaaggcggacaggtatccgtaagcggcagggtcgaacaggagagcgcacg
 agggagcttccaggggaaacgctggtatctttatagctcctgctgggttccacacctgactgagcgtcattttgtgatcctcagc
 gggcgagcctatgaaaaacgaccagcaacgccccttttacgggtcctgcttctgctgcttttgaagctgctcctgatggtcgtcat
 ctactcctggacagcatggcctgcaacgcccgatcccgatcccgggaagcagagaagaatcataatggggaaggccatccagcctc
 gctcg

Фиг. 11В

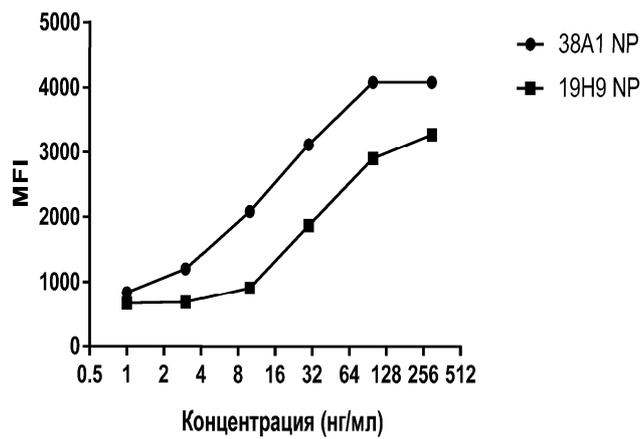
	19H9	38A1
Конц. клеток (на мл)	3.23e6	2.99e6
Объем	120 мл	120 мл
Всего клеток	3.88E+08	3.59E+08
Конц. aPDL1	31.76 мкг/мл	20.20 мкг/мл
Всего aPDL1 (мг)	3.81	2.42
Способность к секреции (мкг на 10 ⁶ клеток)	9.82	6.75

Фиг. 12

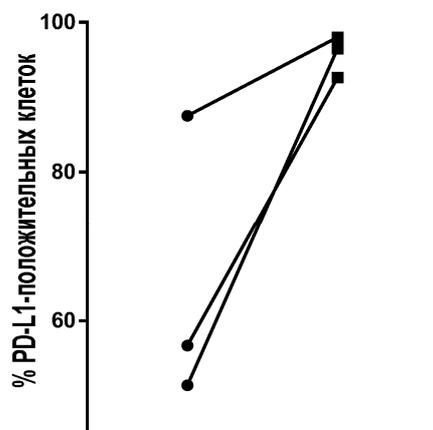


Фиг. 13А

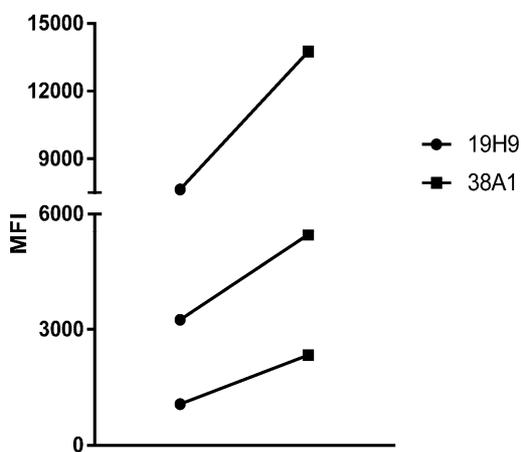
040856



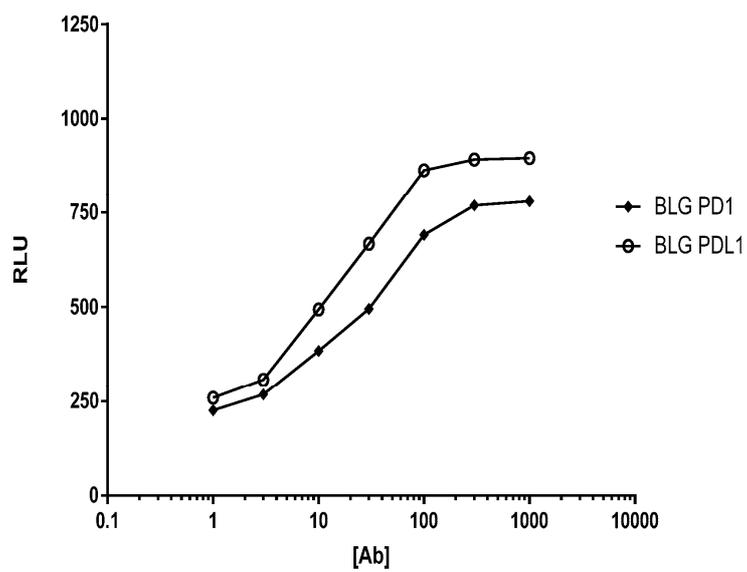
Фиг. 13В



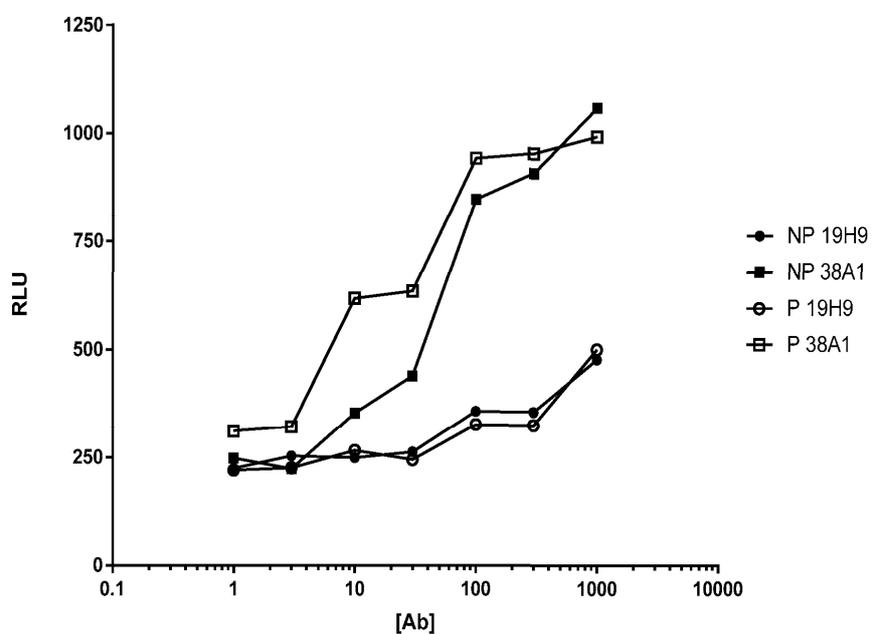
Фиг. 14А



Фиг. 14В

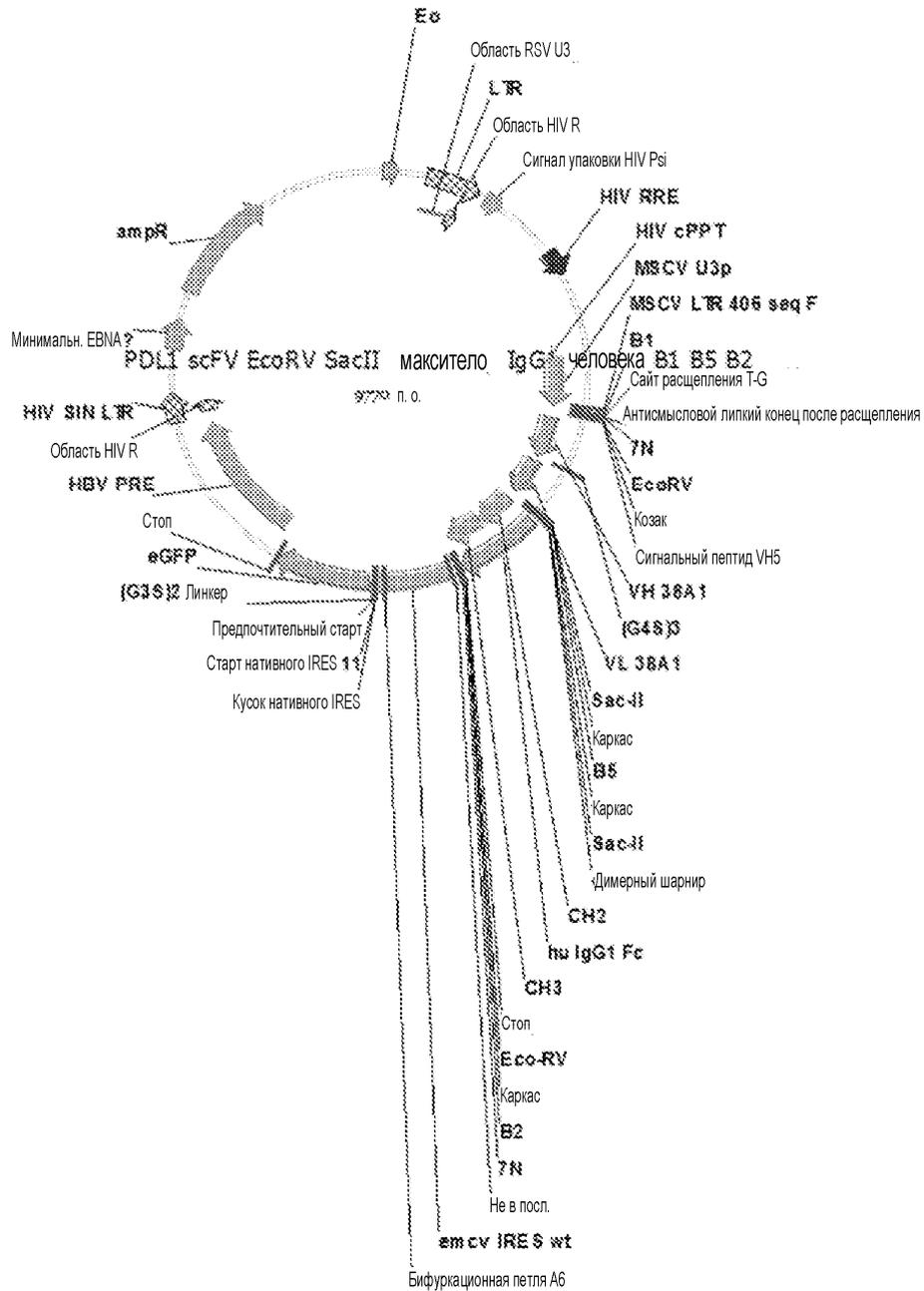


Фиг. 15А



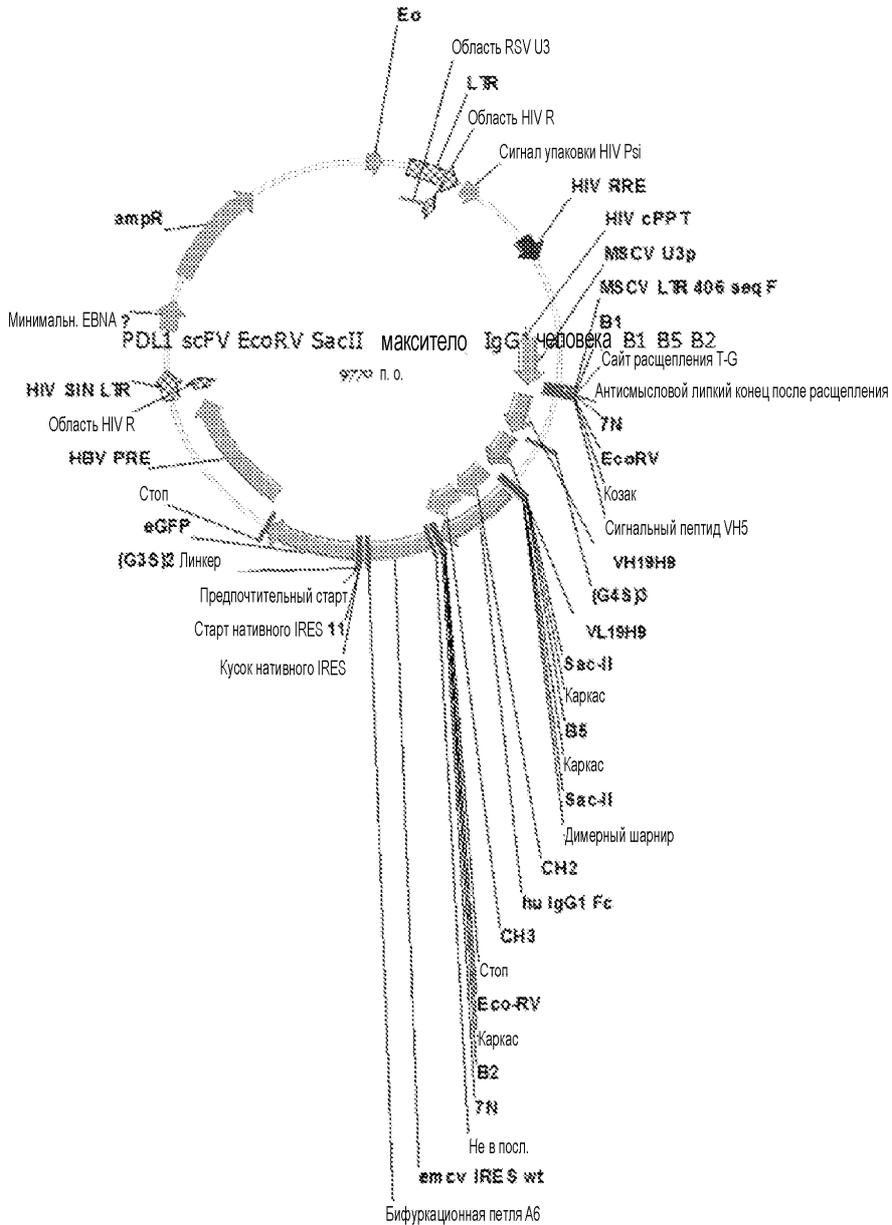
Фиг. 15В

pLV4301G PDLV scFV 38A1



Фиг. 16А

pLV4301G PDLV scFV 19H9



Фиг. 16В

		СНН																				
Индекс EU		118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138
ИгГ1		A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G
ИгГ2		A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	C	S	R	S	T	S	E	S
ИгГ3		A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	C	S	R	S	T	S	G	G
ИгГ4		A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	C	S	R	S	T	S	E	S
Индекс EU		139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159
ИгГ1		T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N
ИгГ2		T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N
ИгГ3		T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N
ИгГ4		T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N
Индекс EU		160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
ИгГ1		S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y
ИгГ2		S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y
ИгГ3		S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y
ИгГ4		S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y
Индекс EU		181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201
ИгГ1		S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N
ИгГ2		S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	R	F	G	T	Q	T	Y	T	C	N
ИгГ3		S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	T	C	N
ИгГ4		S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	K	T	Y	T	C	N
Индекс EU		202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220		
ИгГ1		V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C		
ИгГ2		V	D	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	T	V	E	R	K	C	C		
ИгГ3		V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	R	V	E	L	K	T	P		
ИгГ4		V	D	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	R	V	E	S	K	Y	G		
		Шарнир																				
		Fc >																				
Индекс EU		221			222	223	224	225	226	227	228											
ИгГ1		D			K	T	H	T	C	P	P											
ИгГ2					V	E	C	P	P													
ИгГ3		L	G	D	T	T	H	T	C	P	R	C	P	E	P	K	S	C	D	T	P	P
ИгГ4								P	R	C	P	S										
Индекс EU																						
ИгГ1																						
ИгГ2																						
ИгГ3																						
ИгГ4																						
Индекс EU																						
ИгГ1																						
ИгГ2																						
ИгГ3																						
ИгГ4																						
		Fc >																				
Индекс EU		229	230	231	232	233	234	235	236													
ИгГ1		C	P	A	P	E	L	L	G													
ИгГ2		C	P	A	P	E	V	A														
ИгГ3		E	P	H	S	C	D	T	P	P	P	C	R	R	C	P	A	P	E	L	L	G
ИгГ4		C	P	A	P	E	F	L	G													

СН2		237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	
Индекс EU	IgG1	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	
	IgG2	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	
	IgG3	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	
	IgG4	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	
Индекс EU		258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	
	IgG1	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	
	IgG2	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	
	IgG3	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	
	IgG4	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	
Индекс EU		279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	
	IgG1	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	G	Y	N	S	T	
	IgG2	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	G	Y	N	S	T	
	IgG3	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	G	Y	N	S	T	
	IgG4	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	G	Y	N	S	T	
Индекс EU		300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	
	IgG1	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	
	IgG2	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	
	IgG3	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	
	IgG4	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	
Индекс EU		321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340		
	IgG1	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K		
	IgG2	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K		
	IgG3	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K		
	IgG4	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K		
СН3		341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	
Индекс EU	IgG1	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	D	E	L	T	K	N	
	IgG2	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	D	E	L	T	K	N	
	IgG3	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	D	E	L	T	K	N	
	IgG4	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	D	E	L	T	K	N	
Индекс EU		362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	
	IgG1	G	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	
	IgG2	G	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	
	IgG3	G	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	
	IgG4	G	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	
Индекс EU		383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	
	IgG1	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	
	IgG2	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	
	IgG3	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	
	IgG4	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	
Индекс EU		404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	
	IgG1	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	
	IgG2	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	
	IgG3	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	
	IgG4	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	
Индекс EU		425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	
	IgG1	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	
	IgG2	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	
	IgG3	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	
	IgG4	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	
Индекс EU		446	447																				
	IgG1	G	K																				
	IgG2	G	K																				
	IgG3	G	K																				
	IgG4	G	K																				

Фиг. 17