



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 35/17 (2020.01); A61K 39/0011 (2020.01); C07K 14/7051 (2020.01); C07K 14/70589 (2020.01); C12N 5/0638 (2020.01); C12N 5/0646 (2020.01); C12Y 301/03048 (2020.01); A61K 2039/5158 (2020.01)

(21)(22) Заявка: 2016124280, 21.11.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.11.2014

Дата регистрации:
27.03.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
21.11.2013 GB 1320573.7;
19.06.2014 GB 1410934.2

(43) Дата публикации заявки: 26.12.2017 Бюл. № 36

(45) Опубликовано: 27.03.2020 Бюл. № 9

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 21.06.2016

(86) Заявка РСТ:
GB 2014/053452 (21.11.2014)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2015/075469 (28.05.2015)

Адрес для переписки:
190900, Санкт-Петербург, ВОХ 1125, ООО
"ПАТЕНТИКА"

(72) Автор(ы):

ПЮЛЕ Мартен (GB),
КОНГ Кхай (GB),
КОРДОБА Шон (GB)

(73) Патентообладатель(и):

ЮСиЭл БИЗНЕС ЛТД (GB)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2013/126726 A1, 29.08.2013.
CHICAYBAM L ET AL, "P60: A conditional
system for the activation of lymphocytes
expressing activating and inhibitory CARs",
HUMAN GENE THERAPY, 2010, 21(10): 1418.
FEDOROV V. et al., "Inhibitory chimeric antigen
receptors (iCARs) limit undesirable side effects
of T-cell therapies", Experimental Hematology.
42nd (см. прод.)

(54) КЛЕТКА

(57) Реферат:

Настоящая группа изобретений относится к иммунологии и клеточной биологии. Предложены цитотоксическая Т-клетка и клетка естественного киллера (НК-клетка), содержащие по два химерных антигенных рецептора (CAR), один из которых содержит эндодомен CD3ξ, активирующий клетку в присутствии первого антигена, а второй - домен тирозиновой фосфатазы CD148 или CD45, ингибирующий клетку в отсутствии второго антигена. Такая система CAR позволяет клетке функционировать

по принципу логического оператора "И", т.е. клетка активируется только в присутствии и первого, и второго антигенов. Дополнительно представлены: нуклеиновая кислота и наборы нуклеиновых кислот, кодирующих упомянутые CAR; вектор и способ получения цитотоксической Т-клетки; а также фармацевтическая композиция и способ лечения и/или предотвращения заболевания путем уничтожения опухолевых клеток-мишеней, экспрессирующих первый антиген и второй антиген; применение

фармацевтической композиции и Т-клетки при лечении и/или предотвращения заболевания. 13
изготовлении лекарственного средства и для н. и 14 з.п. ф-лы, 31 ил., 6 табл., 14 пр.

(56) (продолжение):

Annual Scientific Meeting of the ISEH - Society for Hematology and Stem Cells, August 2013, 41(8): S75. CORDOBA S.P. et al., "The large ectodomains of CD45 and CD148 regulate their segregation from and inhibition of ligated T-cell receptor", Blood, May 2013, 121(21):4295-4302. CHEN L, FLIES D.B. "Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition", Nat. Rev. Immunol., Apr 2013, 13(4):227-42.

RU 2717984 C2

RU 2717984 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C12N 5/10 (2006.01)*C12N 5/0783* (2010.01)*A61K 35/17* (2015.01)*C07K 19/00* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 35/17 (2020.01); A61K 39/0011 (2020.01); C07K 14/7051 (2020.01); C07K 14/70589 (2020.01); C12N 5/0638 (2020.01); C12N 5/0646 (2020.01); C12Y 301/03048 (2020.01); A61K 2039/5158 (2020.01)

(21)(22) Application: **2016124280, 21.11.2014**

(24) Effective date for property rights:
21.11.2014

Registration date:
27.03.2020

Priority:

(30) Convention priority:
21.11.2013 GB 1320573.7;
19.06.2014 GB 1410934.2

(43) Application published: **26.12.2017 Bull. № 36**(45) Date of publication: **27.03.2020 Bull. № 9**(85) Commencement of national phase: **21.06.2016**

(86) PCT application:
GB 2014/053452 (21.11.2014)

(87) PCT publication:
WO 2015/075469 (28.05.2015)

Mail address:
190900, Sankt-Peterburg, BOX 1125, OOO
"PATENTIKA"

(72) Inventor(s):

PYULE Marten (GB),
KONG Kkhaj (GB),
KORDOBA Shon (GB)

(73) Proprietor(s):

YUSiEI BIZNES LTD (GB)(54) **CELL**

(57) Abstract:

FIELD: immunology; cell biology.

SUBSTANCE: there are presented cytotoxic T-cell and natural killer cell (NK-cell) containing two chimeric antigenic receptors (CAR), one of which contains CD3ζ endodomain activating the cell in the presence of the first antigen, and the second one—tyrosine phosphatase CD148 or CD45 domain, which inhibits cell in the absence of a second antigen. Such a CAR system allows the cell to function according to the logical "AND" principle, i.e. the cell is activated only in the presence of both the first and second antigens. Additionally presented are: nucleic acid and sets of nucleic acids

coding said CAR; vector and method of producing cytotoxic T-cell; as well as a pharmaceutical composition and a method of treating and/or preventing the disease by killing target tumor cells expressing a first antigen and a second antigen; use of the pharmaceutical composition and T-cell when preparing the medicinal agent and for treating and/or preventing the disease.

EFFECT: as result, T-cell and methods of its use for treating and/or preventing the disease are provided.

27 cl, 31 dwg, 6 tbl, 14 ex

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к клетке, которая содержит больше чем один химерных антигенный рецептор (CAR). Клетка может быть способна специфично распознавать клетку-мишень благодаря отличительному паттерну экспрессии (или неэкспрессии) двух или более антигенов клеткой-мишенью.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Описано множество иммунотерапевтических средств для использования в лечении злокачественных опухолей, в том числе терапевтические моноклональные антитела (mAb), иммуноконъюгированные mAb, радиоконъюгированные mAb и биспецифичные средства, вовлекающие Т-клетки (Bi-specific T-cell Engager[®]).

Типично эти иммунотерапевтические средства направлены на один антиген: например, ритуксимаб направлен на CD20; миелотарг направлен на CD33; и алемтузумаб направлен на CD52.

Однако, относительно редко присутствия (или отсутствия) одного антигена достаточно для того, чтобы описать злокачественную опухоль, что может вести к недостатку специфичности.

Большинство злокачественных опухолей нельзя дифференцировать от нормальных тканей на основании одного антигена. Таким образом, при терапии возникает существенная токсичность «в мишени вне опухоли», посредством которой происходит повреждение нормальных тканей. Например, в то время, как направленно воздействуют на CD20 для того, чтобы лечить В-клеточные лимфомы ритуксимабом, происходит истощение компартмента нормальных В-клеток, в то время, как направленно воздействуют на CD52 для того, чтобы лечить хронический лимфоцитарный лейкоз, происходит истощение всего лимфоидного компартмента, в то время, как направленно воздействуют на CD33 для того, чтобы лечить острый миелолейкоз, происходит повреждение всего миелоидного компартмента, и т.д.

Предсказанная проблема токсичности «в мишени вне опухоли» обнаружена в клинических исследованиях. Например, подход, в котором направленно воздействуют на ERBB2, вызвал смерть у пациента со злокачественной опухолью ободочной кишки, метастазировавшей в легкие и печень. У некоторых пациентов со злокачественной опухолью ободочной кишки повышена экспрессия ERBB2, но также он экспрессирован в некоторых нормальных тканях, включая сердце и нормальное сосудистое русло.

Для некоторых злокачественных опухолей направленное воздействие на присутствие двух антигенов злокачественной опухоли может быть более избирательным и, следовательно, эффективным, чем направленное воздействие на один. Например, хронический В-лимфоцитарный лейкоз (В-CLL) представляет собой обыкновенный лейкоз, который в настоящее время лечат посредством направленного воздействия на CD19. Это лечит лимфому, но также истощает весь компартмент В-клеток, так что лечение имеет существенный токсический эффект. В-CLL имеет необычный фенотип в том отношении, что совместно экспрессируются CD5 и CD19. Посредством направленного воздействия только на клетки, которые экспрессируют CD5 и CD19, будет возможно значительно снижать токсичность в мишени вне опухоли.

Таким образом, существует потребность в иммунотерапевтических средствах, которые способны к дополнительному направленному воздействию, чтобы отражать комплексный паттерн экспрессии маркеров, который связан со многими злокачественными опухолями.

Химерные антигенные рецепторы (CAR)

Химерные антигенные рецепторы представляют собой белки, которые прививают

специфичность моноклонального антитела (mAb) эффекторной функции Т-клетки. Их обычная форма относится к белку с трансмембранным доменом I типа с антигенраспознающим аминоконцом, спейсером, трансмембранным доменом, все соединены в составной эндодоме, который передает сигналы выживаемости и активации Т-клеток (см. фиг. 1А).

Наиболее распространенной формой этих молекул являются слитные конструкции из одноцепочечных вариабельных фрагментов (scFv), полученных из моноклональных антител, распознающих антигенмишень, которые слиты через спейсер и трансмембранный домен с сигнальным эндодоме. Такие молекулы вызывают активацию Т-клетки в ответ на распознавание с помощью scFv его мишени. Когда Т-клетки экспрессируют такой CAR, они распознают и уничтожают клеткимишени, которые экспрессируют антигенмишень. Разработано несколько CAR против опухоляссоциированных антигенов, и в настоящее время клинические исследования проходят подходы адоптивного переноса с использованием таких CARэкспрессирующих Тклеток для лечения различных злокачественных опухолей.

Однако использование CARэкспрессирующих Тклеток также связано с токсичностью в мишени вне опухоли. Например, основанный на CAR подход, направленно воздействующий на карбоксиангидразу-IX (CAIX) для того, чтобы лечить почечноклеточную карциному, приводил к печеночной токсичности, которая предположительно обусловлена специфичной атакой на эпителиальные клетки желчного протока (Lamers et al (2013) Mol. Ther. 21:904-912).

Подходы двойного направленного воздействия с использованием CAR

Для того чтобы решить проблему токсичности «в мишени вне опухоли», разработаны CAR Тклетки с двойной антигенной специфичностью. В подходе «двойного направленного воздействия», два комплементарных CAR совместно экспрессируют в одной и той же популяции Тклеток, каждый направлен на отделенную опухолевую мишень и сконструирован для того, чтобы предоставлять комплементарные сигналы.

Wlikie et al (2012 J Clin Immunol 32:1059-1070) описывают подход двойного направленного воздействия, в котором совместно экспрессируют ErbB2- и MUC1-специфичные CAR. ErbB2-специфичный CAR предоставлял только CD3 ξ сигнал и MUC1-специфичный CAR предоставлял только CD28 костимуляторный сигнал. Обнаружено, что комплементарная передача сигналов возникала в присутствии обоих антигенов, что приводило к продукции IL-2. Однако продукция IL-2 была умеренной по сравнению с контрольными Тклетками со сконструированными CAR, в которых передачу сигналов обеспечивает слитный CD28+CD3 ξ эндодоме.

Схожий подход описан у Kloss et al (2013 Nature Biotechnol. 31:71-75), в котором использовали CD-19-специфичный CAR, который предоставляет CD3 ξ -опосредованный активационный сигнал в комбинации с химерным костимуляторным рецептором, специфичным к PSMA. С использованием этой конструкции «совместных CAR» CAR Тклетка получает активационный, сигнал когда она встречается клеткумишень с одним антигеном, и костимуляторный сигнал, когда она встречается клеткумишень с другим антигеном, и получает и активирующий и костимуляторный сигналы только когда встречается клеткимишени, несущие оба антигена.

Это является ранней попыткой ограничения CAR активности только клеткоймишенью, несущей два антигена. Однако этот подход ограничен: несмотря на то, что активность CAR Тклетки будет наибольшей в отношении мишеней, экспрессирующих оба антигена, CAR Тклетка все же будет уничтожать мишени, экспрессирующие только антиген, распознаваемый с помощью активирующего CAR; кроме того, костимуляция

ведет к пролонгированным эффектам, оказываемым на Т-клетки, которые делятся после ухода клетки-мишени. Таким образом, активность против положительных по одному антигену Т-клеток, равная активности против двойных положительных, может быть возможна, например, в ситуации, когда одинарные положительные ткани находятся смежно с двойной положительной опухолью или на миграционном пути от нее.

Таким образом, существует потребность в усовершенствованных терапевтических подходах на основе CAR со сниженной токсичностью в мишени вне опухоли, где активация Т-клеток полностью ограничена клетками-мишенями, которые экспрессируют оба антигена.

ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фиг. 1: (а) обобщенная архитектура CAR: связывающий домен распознает антиген; спейсер поднимает связывающий домен с клеточной поверхности; трансмембранный домен заякоривает белок в мембране и эндодомен передает сигналы. С (b) до (d): различные поколения и перестановки эндодоменов CAR: (b) начальные конструкции передавали ITAM сигналы только через эндодомен FcεR1-γ или CD3ξ, тогда как более поздние конструкции передавали дополнительный (c) один или (d) два костимуляторных сигнала в цис.

Фиг. 2: схематическое изображение, которое иллюстрирует изобретение

Изобретение относится к конструированию Т-клеток, чтобы реагировать на логические правила антигенной экспрессии клетки-мишени. Это лучше всего проиллюстрировано с помощью воображаемой диаграммы рассеяния при FACS. Популяции клеток-мишеней экспрессируют оба, любой один или ни одного из антигенов «А» и «В». Различные популяции-мишени (помечены красным) подвержены уничтожению Т-клетками, трансдуцированными парой CAR, соединенных с помощью различных логических элементов. При использовании рецепторов с логическим элементом ИЛИ будут уничтожены как одинарные положительные, так и двойные положительные клетки. При использовании рецепторов с логическим элементом И погибают только двойные положительные клетки-мишени. При использовании логического элемента И НЕ двойные положительные мишени сохранены, тогда как одинарные положительные мишени

Фиг. 3: создание популяций клеток-мишеней

Клетки SupT1 использовали в качестве клеток-мишеней. Эти клетки трансдуцировали для того, чтобы экспрессировать любое из CD19 и CD33 или оба CD19 и CD33. Клетки-мишени окрашивали подходящими антителами и анализировали с помощью проточной цитометрии.

Фиг. 4: конструкция кассеты для логического элемента ИЛИ

Одна открытая рамка считывания обеспечивает оба CAR с последовательностью FMD-2A с сохранением рамки, что ведет к двум белкам. Сигнал1 представляет собой сигнальный пептид, полученный из IgG1 (но может представлять собой любой эффективный сигнальный пептид). scFv1 представляет собой одноцепочечный переменный сегмент, который распознает CD19 (но может представлять собой scFv или пептидную петлю или лиганд или фактически любой домен, который распознает любую желаемую произвольную мишень). STK представляет собой «стебель» CD8, но может представлять собой любой подходящий внеклеточный домен. CD28tm представляет собой трансмембранный домен CD28, но может представлять собой любой стабильный трансмембранный домен белка I типа и CD3Z представляет собой дзета-эндодомен CD3, но может представлять собой любой эндодомен, который содержит ITAM. Сигнал2 представляет собой сигнальный пептид, полученный из CD8,

но может представлять собой любой эффективный сигнальный пептид, который отличается по последовательности ДНК от сигнала1. scFv распознает CD33, но как и для scFv1, является произвольным. HC2CH3 представляет собой шарнир-CH2-CH3 из IgG1 человека, но может представлять собой любой внеклеточный домен, который не образует перекрестную пару со спейсером, используемым в первом CAR. CD28tm' и CD3Z' кодируют ту же белковую последовательность, что и CD28tm и CD3Z, но в них внесена неоднозначность кодонов для того, чтобы предотвращать гомологичную рекомбинацию.

Фиг. 5: схематическое представление химерных антигенных рецепторов (CAR) для логического элемента ИЛИ

Конструировали стимулирующие CAR, содержащие любой из N-концевой А) scFV-домен против CD19, за которым следует внеклеточная шарнирная область CD8 человека или В) scFV-домен против CD33, за которым следует область внеклеточного шарнира, CH2 и CH3 (содержащая мутацию rvaа для того, чтобы снижать связывание FcR) из IgG1 человека. Оба рецептора содержат трансмембранный домен CD28 человека и внутриклеточный дзета-домен CD3 человека (CD247). «S» обозначает присутствие дисульфидных связей.

Фиг. 6: экспрессионные данные, показывающие коэкспрессию обоих CAR на поверхности одной Т-клетки.

Фиг. 7: функциональный анализ логического элемента ИЛИ

Эффекторные клетки (5×10^4 клеток), экспрессирующие конструкцию логического элемента ИЛИ, совместно инкубировали с различным числом клеток-мишеней и анализировали IL-2 после 16 часов с помощью ELISA. На графике представлен усредненная максимальная секреция IL-2 от химической стимуляции (РМА и иономицин) только эффекторных клеток и усредненный фоновый IL-2 от эффекторных клеток без какого-либо стимула из трех повторений.

Фиг. 8: схематическое представление, показывающее обе версии кассеты, используемой для экспрессии обоих логических элементов И

Активирующие и ингибирующие CAR совместно экспрессировали еще раз с использованием последовательности FMD-2A. Сигнал1 представляет собой сигнальный пептид, полученный из IgG1 (но может представлять собой любой эффективный сигнальный пептид). scFv1 представляет собой одноцепочечный вариабельный сегмент, который распознает CD19 (но может представлять собой scFv или пептидную петлю или лиганд или фактически любой домен, который распознает какую-либо желаемую произвольную мишень). STK представляет собой «стебель» CD8, но может представлять собой любой некрупный внеклеточный домен. CD28tm представляет собой трансмембранный домен CD28, но может представлять собой любой стабильный трансмембранный домен белка I типа и CD3Z представляет собой дзета-эндодомен CD3, но может представлять собой любой эндодомен, который содержит ITAM. Сигнал2 представляет собой сигнальный пептид, полученный из CD8, но может представлять собой любой эффективный сигнальный пептид, который отличается последовательностью ДНК от сигнала1. scFv распознает CD33, но как и для scFv1, является произвольным. HC2CH3 представляет собой шарнир-CH2-CH3 из IgG1 человека, но может представлять собой любой крупный внеклеточный домен. CD45 и CD148 представляют собой трансмембранные и эндодомены CD45 и CD148, соответственно, но могут быть получены из любого белка этого класса.

Фиг. 9: схематическое представление структуры белков химерных антигенных рецепторов (CAR) для логических элементов И

Стимулирующий CAR состоит из N-концевого scFV-домена против CD19, за которым следует область внеклеточного «стебля» из CD8 человека, трансмембранный домен CD28 человека и внутриклеточного дзета-домена CD3 человека (CD247). Тестировали два ингибирующих CAR. Они состоят из N-концевого scFV-домена против CD33, за которым следует область внеклеточного шарнира, CH2 и CH3 (содержащая мутацию рваа для того, чтобы снижать связывание FcR) из IgG1 человека, за которой следует трансмембранный и внутриклеточный домен любого из CD148 или CD45 человека. «S» обозначает присутствие дисульфидных связей.

Фиг. 10: коэкспрессия активирующих и ингибирующих CAR

В качестве эффекторных клеток использовали клетки BW5147, которые трансдуцировали для того, чтобы экспрессировать как активирующий CAR против CD19, так и один из ингибирующих CAR против CD33. Эффекторные клетки окрашивали с использованием Fc мыши к CD19 и Fc кролика к CD33 и подходящих вторичных антител и анализировали с помощью проточной цитометрии.

Фиг. 11: функциональный анализ логических элементов И

Эффекторные клетки (5×10^4 клеток), экспрессирующие активирующий CAR против CD19 и ингибирующий CAR против CD33 с внутриклеточным доменом А) CD148 или В) CXD45, совместно инкубировали с различным числом клеток-мишеней и анализировали IL-2 после 16 часов с помощью ELISA. На графике представлена максимальная секреция IL-2 от химической стимуляции (PMA и иономицин) только эффекторных клеток и фоновый IL-2 от эффекторных клеток без какого-либо стимула из трех повторений.

Фиг. 12: схематическое представление трех версий кассеты, используемой для того, чтобы генерировать логический элемент И НЕ

Активирующие и ингибирующие CAR совместно экспрессировали еще раз с использованием последовательности FMD-2A. Сигнал1 представляет собой сигнальный пептид, полученный из IgG1 (но может представлять собой любой эффективный сигнальный пептид). scFv1 представляет собой одноцепочечный вариабельный сегмент, который распознает CD19 (но может представлять собой scFv или пептидную петлю или лиганд или фактически любой домен, который распознает любую желаемую произвольную мишень). STK представляет собой «стебель» CD8 человека, но может представлять собой любой некрупный внеклеточный домен. CD28tm представляет собой трансмембранный домен CD28, но может представлять собой любой стабильный трансмембранный домен белка I типа, и CD3Z представляет собой дзета-эндодомен CD3, но может представлять собой любой эндодомен, который содержит ITAM. Сигнал2 представляет собой сигнальный пептид, полученный из CD8, но может представлять собой любой эффективный сигнальный пептид, который отличается последовательностью ДНК от сигнала1. scFv распознает CD33, но как и для scFv1, является произвольным. muSTK представляет собой «стебель» CD8 мыши, но может представлять собой любой спейсер, который совместно локализован, но не образует перекрестные пары с таковым из активирующего CAR. dPTPN6 представляет собой фосфатазный домен из PTPN6. LAIR1 представляет собой трансмембранный и эндодомен из LAIR1. 2Aw представляет собой версию последовательности FMD-2A с неоднозначностью кодонов. SH2-CD148 представляет собой домен SH2 из PTPN6, слитый с фосфатазным доменом из CD148.

Фиг. 13: схематическое представление химерных антигенных рецепторов (CAR) для логических элементов НЕ И

А) стимулирующий CAR, состоящий из N-концевого scFV-домена против CD19, за

которым следует область «стебля» из CD8 человека, трансмембранный домен CD28 человека и внутриклеточный домен CD247 человека. В) ингибирующий CAR, состоящий из N-концевого scFV-домена против CD33, за которым следует область «стебля» из CD8 мыши, трансмембранная область из CD8 мыши и фосфатазный домен из PTPN6.

5 С) ингибирующий CAR, состоящий из N-концевого scFV-домена против CD33, за которым следует область «стебля» из CD8 мыши и трансмембранный и внутриклеточный сегменты из LAIR1. D) ингибирующий CAR, идентичный предыдущему CAR, за исключением того, что его коэкспрессируют со слитным белком из домена SH2 PTPN6 и фосфатазного домена CD148.

10 Фиг. 14: функциональный анализ логического элемента НЕ И

Эффекторные клетки (5×10^4 клеток), экспрессирующие А) полноразмерный SHP-1 или В) усеченную форму SHP-1, совместно инкубировали с различным числом клеток-мишеней и анализировали IL-2 после 16 часов с помощью ELISA. На графике представлена усредненная максимальная секреция IL-2 от химической стимуляции (РМА и иономицин) только эффекторных клеток и усредненный фоновый IL-2 от эффекторных
15 клеток без какого-либо стимула из трех повторений.

Фиг. 15: аминокислотная последовательность логического элемента ИЛИ

Фиг. 16: аминокислотная последовательность логического элемента И на основе CD148 и CD145

20 Фиг. 17: аминокислотная последовательность двух логических элементов И НЕ

Фиг. 18: разбор функции логического элемента И

А. Прототип логического элемента И проиллюстрирован справа и его функция в ответ на одинарные CD19, CD33 и двойные CD19, CD33 положительные мишени представлена слева. В. ScFv меняют местами так, что активирующий эндодомен запускаяют с помощью CD33, а ингибирующий эндодомен активируют с помощью CD19.
25 Этот логический элемент И остается функциональным, несмотря на то, что эти scFv меняют местами. С. «Стебель» CD8 мыши заменял Fc в спейсере ингибирующего CAR. При этой модификации логический элемент не способен реагировать на любую из одинарной CD19 положительной или двойной CD19, CD33 положительной мишеней.

30 Фиг. 19: экспрессия антигенов-мишеней на искусственных клетках-мишенях

А. Представлены диаграммы рассеяния при проточной цитометрии CD19 в сравнении с CD33 из исходного набора искусственных клеток-мишеней, полученных из клеток SupT1. Слева направо: двойные негативные клетки SupT1, клетки SupT1, положительные по CD19, положительные по CD33 и положительные по CD19 и CD33. В. Представлены
35 диаграммы рассеяния при проточной цитометрии CD19 в сравнении с GD2 из искусственных клеток-мишеней, созданных для того, чтобы тестировать логический элемент CD19 И GD2. Слева направо: негативные клетки SupT1, клетки SupT1, экспрессирующие CD19, клетки SupT1, трансдуцированные векторами синтазы GD2 и GM3, которые становятся GD2 положительными, и клетки SupT1, трансдуцированные с использованием CD19, а также синтазы GD2 и GM3, которые положительны по обоим GD2 и CD19. С. Представлены диаграммы рассеяния при проточной цитометрии для CD19 в сравнении с EGFRvIII из искусственных мишеней, созданных для того, чтобы тестировать логический элемент CD19 И EGFRvIII. Слева направо: негативные клетки SupT1, клетки SupT1, экспрессирующие CD19, клетки SupT1, трансдуцированные с
40 использованием EGFRvIII, и клетки SupT1, трансдуцированные с использованием как CD19, так и EGFRvIII. D. Представлены диаграммы рассеяния при проточной цитометрии для CD19 в сравнении с CD5 из искусственных мишеней, созданных для того, чтобы тестировать логический элемент CD19 И CD5. Слева направо: негативные 293Т клетки,

293Т клетки, трансдуцированные с использованием CD19, 293Т клетки, трансдуцированные с использованием CD5, 293Т клетки, трансдуцированные с использованием обоих векторов CD5 и CD19.

Фиг. 20: Генерализуемость логического элемента И

5 А. Схематическое изображение логического элемента И, модифицированного так, что специфичность второго CAR изменена с исходной специфичности CD33, чтобы генерировать 3 новых CAR: CD19 И GD2, CD19 И EGFRvIII, CD19 И CD5. В. Логический элемент CD19 И GD2 И: слева: экспрессия логического элемента И показана окрашиванием рекомбинантным CD19-Fc (ось x) для CD19 CAR, в зависимости от
10 окрашивания против Fc человека (ось y) для GD2 CAR. Справа: функция в ответ на одинарные положительные и двойные положительные мишени. С. Логический элемент CD19 И EGFRvIII И: слева: экспрессия логического элемента И показана окрашиванием рекомбинантным CD19-Fc (ось x) для CD19 CAR, в зависимости от окрашивания против Fc человека (ось y) для EGFRvIII CAR. Справа: функция в ответ на одинарные
15 положительные и двойные положительные мишени. D. Логический элемент CD19 И CD5 И: слева: экспрессия логического элемента И показана окрашиванием рекомбинантного CD19-Fc (ось x) для CD19 CAR, в зависимости от окрашивания против Fc человека (ось y) для CD5 CAR. Справа: функция в ответ на одинарные положительные и двойные положительные мишени.

20 Фиг. 21: функция логических элементов И НЕ

Представлена функция трех реализаций логического элемента И НЕ. Схематическое представление протестированных логических элементов приведено справа, а функция в ответ на одинарные положительные и двойные положительные мишени приведена
25 слева. А. Логический элемент И НЕ на основе RTPN6, посредством которого первый CAR распознает CD19, имеет спейсер «стебля» CD8 человека и ITAM-содержащий активирующий эндодомен; коэкспрессируют со вторым CAR, который распознает CD33, имеет спейсер «стебля» CD8 мыши и имеет эндодомен, который содержит фосфатазный домен RTPN6. В. логический элемент И НЕ на основе ITIM идентичен логическому элементу RTPN6, за исключением того, что эндодомен заменяют на
30 эндодомен из LAIR1. С. Усиленный CD148 логический элемент И НЕ идентичен логическому элементу на основе ITIM, за исключением того, что экспрессируют дополнительное слияние между RTPN6 SH2 и эндодоменом из CD148. Все три логических элемента работают в соответствии с ожиданиями с активацией в ответ на CD19, но не в ответ на CD19 и CD33 вместе.

35 Фиг. 22: Разбор функции логического элемента И НЕ на основе RTPN6

Исходный логический элемент И НЕ на основе RTPN6 сравнивают с несколькими контролями для того, чтобы продемонстрировать модель. Схематическое представление протестированных логических элементов приведено справа, а функция в ответ на
40 одинарные положительные и двойные положительные мишени приведена слева. А. Исходный логический элемент И НЕ, с помощью которого первый CAR распознает CD19, имеет спейсер «стебля» CD8 человека и ITAM-содержащий активирующий эндодомен; коэкспрессируют со вторым CAR, который распознает CD33, имеет спейсер «стебля» CD8 мыши и имеет эндодомен, состоящий из фосфатазного домена RTPN6. В. Логический элемент И НЕ, модифицированный так, что спейсер «стебля» CD8 мыши
45 заменен на Fc спейсер. С. Логический элемент И НЕ, модифицированный с тем, чтобы заменить фосфатазный домен RTPN6 на эндодомен из CD148. Исходный логический элемент И НЕ (А.) функционирует в соответствии с ожиданиями, запускаясь в ответ на CD19, но не в ответ на оба CD19 и CD33. Логический элемент в В. запускается как в


ответ только на CD19 или вместе на CD19 и CD33. Логический элемент в С. не запускается в ответ на одну или обе мишени.

Фиг. 23: разбор логического элемента И НЕ на основе LAIR1

Показана функциональная активность против CD19 положительных, CD33 положительных и CD19, CD33 двойных положительных мишеней. А. Структура и активность исходного логического элемента И НЕ на основе ITIM. Этот логический элемент состоит из двух CAR: первый распознает CD19, имеет спейсер «стебля» CD8 человека и ITAM-содержащий эндодомен; второй CAR распознает CD33, имеет спейсер «стебля» CD8 мыши и ITIM-содержащий эндодомен. В. Структура и активность контрольного логического элемента на основе ITIM, где спейсер «стебля» CD8 мыши заменен на Fc домен. Этот логический элемент состоит из двух CAR: первый распознает CD19, имеет спейсер «стебля» CD8 человека и ITAM-содержащий эндодомен; второй CAR распознает CD33, имеет Fc спейсер и ITIM-содержащий эндодомен. Оба логических элемента отвечают на одинарные CD19 положительные мишени, тогда как только исходный логический элемент неактивен в ответ на двойные CD19 и CD33 положительные мишени.

Фиг. 24: Модель кинетической сегрегации логических элементов CAR

Модель кинетической сегрегации и поведения логического элемента И, логического элемента НЕ И и контролей. CAR распознают или CD19 или CD33. Иммунологический синапс можно представить между голубой линией, которая представляет мембрану клетки-мишени, и красной линией, которая представляет Т-клеточную мембрану. «45» представляет нативный белок CD45, присутствующий на Т-клетках. «Н8» представляет эктодомен CAR со «стеблем» CD8 человека в качестве спейсера. «Fc» представляет эктодомен CAR с HCH₂CH₃ человека в качестве спейсера. «М8» представляет собой эктодомен CAR с мышинным «стеблем» CD8 в качестве спейсера. «19» представляет CD19 на поверхности клетки-мишени. «33» представляет CD33 на поверхности клетки-мишени. Символ «Φ» представляет активирующий эндодомен, содержащий ITAM.

Символ «» представляет фосфатазу с медленной кинетикой - «включаемый

лигированием» эндодомен, такой как тот, что содержит каталитический домен из RPTN6 или ITIM. Символ «∅» представляет фосфатазу с быстрой кинетикой - «выключаемый лигированием» эндодомен, такой как эндодомен из CD45 или CD148. Этот символ увеличен на фиг., чтобы подчеркнуть его высокую активность.

(а) Представлено предполагаемое поведение функционального логического элемента И, который содержит пару CAR, посредством чего первый CAR распознает CD19, имеет спейсер «стебля» CD8 человека и активирующий эндодомен; и второй CAR распознает CD33, имеет Fc спейсер и эндодомен CD148;

(б) Представлено предполагаемое поведение контрольного логического элемента И. Здесь первый CAR распознает CD19, имеет спейсер «стебля» CD8 человека и активирующий эндодомен; и второй CAR распознает CD33, но имеет спейсер «стебля» CD8 мыши и эндодомен CD148;

(с) Представлено поведение функционального логического элемента И НЕ, который содержит пару CAR, посредством чего первый CAR распознает CD19, имеет спейсер «стебля» CD8 человека и активирующий эндодомен; и второй CAR распознает CD33,

имеет спейсер «стебля» CD8 мыши и эндодомен PTPN6;

(d) Представлено предполагаемое поведение контрольного логического элемента И НЕ, который содержит пару CAR, посредством чего первый CAR распознает CD19, имеет спейсер «стебля» CD8 человека и активирующий эндодомен; и второй CAR

5 распознает CD33, но имеет Fc спейсер и эндодомен PTPN6;

В первой колонке клетки-мишени являются негативными как по CD19, так и по CD33. Во второй колонке мишени являются CD19 негативными и CD33 положительными. В третьей колонке клетки-мишени являются CD19 положительными и CD33 негативными. В четвертой колонке клетки-мишени являются положительными как по CD19, так и по

10 CD33.

Фиг. 25: Конструкция CAR на основе APRIL.

Конструкцию CAR модифицировали с тем, чтобы заменять scFv на модифицированную форму индуцирующего пролиферацию лиганда (APRIL), который взаимодействует с BCMA, TACI и протеогликанами, чтобы действовать в качестве

15 антигенсвязывающего домена: APRIL усечен с тем, чтобы отсутствовал аминоконец, связывающий протеогликан. После этого сигнальный пептид прикрепляли к усеченному аминоконцу APRIL, чтобы направлять белок на клеточную поверхность. Эти CAR генерировали с использованием этого связывающего домена на основе APRIL:

А. В первом CAR домен «стебля» CD8 человека использовали в качестве спейсерного домена. В. Во втором CAR шарнир из IgG1 использовали в качестве спейсерного домена. С. В третьем CAR домены шарнира, CH2 и CH3 из IgG1 человека, модифицированные

20 мутациями rva/a, описанными у Hombach et al (2010 Gene Ther. 17:1206-1213) для того, чтобы снижать связывание Fc рецептора, использовали в качестве спейсера (в дальнейшем обозначают как Fc-rvaa). Во всех CAR эти спейсеры соединяли с

25 трансмембранным доменом CD28 и затем с тройным эндодоменом, содержащим слияние CD28, OX40 и дзета-эндодомена CD3 (Pule et al, Molecular Therapy, 2005: том 12; выпуск 5; стр. 933-41).

Фиг. 26: аннотированная аминокислотная последовательность трех вышеприведенных APRIL-CAR

30 А: представлена аннотированная аминокислотная последовательность CAR со «стеблем» CD8 и APRIL; В: представлена аннотированная аминокислотная последовательность CAR на основе шарнира IgG1 и APRIL; С: представлена аннотированная аминокислотная последовательность CAR на основе APRIL и Fc-rvaa.

Фиг. 27: экспрессия и связывание лиганда различными CAR на основе APRIL

35 А. Рецепторы совместно экспрессировали с маркерным геном усеченным CD34 в векторе с ретровирусными генами. Экспрессия маркерного гена на трансдуцированных клетках делает возможным подтверждение трансдукции. В. Т-клетки трансдуцировали с использованием CAR на основе APRIL и спейсера из «стебля» CD8, шарнира IgG1 или Fc спейсера. Для того чтобы тестировать возможность стабильной экспрессии этих

40 рецепторов на клеточной поверхности, затем Т-клетки окрашивали с APC против APRIL-биотина/стрептавидина и против CD34. Осуществляли анализ проточной цитометрии. APRIL в равной мере обнаруживали на клеточной поверхности в трех CAR, что наводит на мысль об их стабильной экспрессии в равной мере. С. Затем определяли способность CAR распознавать TACI и BCMA. Трансдуцированные Т-клетки окрашивали с

45 использованием или рекомбинантного BCMA или TACI, слитого со слитной конструкцией IgG2a мыши Fc, наряду со вторичным против мыши и против CD34. Все три формата рецепторов демонстрировали связывание как с BCMA, так и с TACI. К удивлению, обнаруживали, что связывание BCMA казалось большим, чем с TACI. Кроме

того, к удивлению обнаруживали, что несмотря на то, что все три CAR были экспрессированы в равной мере, CAR со «стеблем» CD8 и шарниром IgG1 выглядели лучше при распознавании BCMA и TACI, чем тот, что с Fc спейсером.

Фиг. 28: функция различных конструкций CAR.

- 5 Осуществляли функциональный анализ с использованием трех различных CAR на основе APRIL. Т-клетки периферической крови нормального донора или не трансдуцировали (NT) или трансдуцировали для того, чтобы экспрессировать различные CAR. Трансдукцию осуществляли с использованием супернатантов с равными титрами. Затем эти Т-клетки обедняли по CD56 для того, чтобы удалять неспецифичную NK
- 10 активность и использовали в качестве эффекторов. Клетки SupT1, которые или не трансдуцировали (NT) или трансдуцировали для того, чтобы экспрессировать BCMA или TACI, использовали в качестве мишеней. Представленные данные представляют собой среднее и стандартное отклонение из 5 независимых экспериментов. А. Специфичное уничтожение Т-клеток, экспрессирующих BCMA и TACI, определяли с
- 15 использованием высвобождения хрома. В. Также определяли высвобождение интерферона- μ . Мишени и эффекторы совместно культивировали в соотношении 1:1. После 24 часов интерферон- μ в супернатанте анализировали с помощью ELISA. С. Пролиферация/выживаемость Т-клеток с CAR также определяли посредством подсчета числа Т-клеток с CAR в той же совместной культуре, которую инкубировали в течение
- 20 дополнительных 6 суток. Все 3 CAR направляют ответ против мишеней, экспрессирующих BCMA и TACI. Ответы на BCMA были больше, чем для TACI.

Фиг. 29: функциональность логического элемента И в первичных клетках

- РВМС выделяли из крови и стимулировали с использованием РНА и IL-2. Двумя сутками позже клетки трансдуцировали на покрытых ретронектином планшетах
- 25 ретровирусом, содержащим конструкцию CD19:CD33 логического элемента И. На сутки 5 уровень экспрессии двух CAR, транслируемых с помощью конструкции логического элемента И, оценивали через проточную цитометрию, и клетки обедняли по CD56+ клеткам (преимущественно естественные киллерные клетки). В сутки 6 РВМС помещали в совместную культуру с клетками-мишенями с соотношением эффектора к клетке-
- 30 мишени 1:2. В сутки 8 супернатант собирали и анализировали на секрецию IFN- γ с помощью ELISA

- Фиг. 30: показан отбор/иерархия возможных спейсерных доменов увеличивающегося размера. Эктодомен CD3-дзета предложен в качестве самого короткого возможного спейсера, за которым следует (b) шарнир IgG1. (c) «стебель» CD8 мыши или человека,
- 35 и эктодомены CD28 считают промежуточными по размеру и совместно сегрегирующимися. (d) домен шарнира, CH2 и CH3 из IgG1 больше и объемнее, и (e) шарнир, CH2, CH3 и CH4 домен из IgM еще больше. Учитывая свойства молекул-мишеней и эпитопа связывающих доменов на указанных молекулах-мишенях, возможно использовать эту иерархию спейсеров для того, чтобы создавать CAR систему передачи
- 40 сигналов, которая или совместно сегрегируется или сегрегируется отдельно при формировании синапса.

- Фиг. 31: правила конструирования для создания Т-клеток с CAR с логическими элементами. CAR с логическими элементами ИЛИ, И НЕ и И представлены в схематическом формате с клеткой-мишенью сверху и Т-клеткой внизу и с синапсом в
- 45 середине. Клетки-мишени экспрессируют произвольные антигены-мишени А и В.

Т-клетки экспрессируют два CAR, которые содержат распознающие домены против А и против В, спейсеры и эндодомены. Для логического элемента ИЛИ необходимы (1) спейсеры, которые просто делают возможным антигенное распознавание и активацию

CAR, и (2) оба CAR, имеющие активирующие эндодомены; для логического элемента И НЕ необходимы (1) спейсеры, которые ведут к совместной сегрегации обоих CAR при распознавании обоих антигенов и (2) один CAR с активирующим эндодоменом, и другой, эндодомен которого содержит или вовлекает слабую фосфатазу; для логического

5 элемента И необходимы (1) спейсеры, которые ведут к сегрегации обоих CAR в различные части иммунологического синапса при распознавании обоих антигенов и (2) один CAR с активирующим эндодоменом, и другой, эндодомен которого содержит сильную фосфатазу.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ АСПЕКТОВ ИЗОБРЕТЕНИЯ

10 Авторы настоящего изобретения разработали панель пар химерных антигенных рецепторов «с логическими элементами», которые при экспрессии клеткой, такой как Т-клетка, способны обнаруживать конкретный паттерн экспрессии по меньшей мере из двух антигенов-мишеней. Если по меньшей мере два антигена-мишени произвольно обозначены, как антиген А и антиген В, три возможных варианта представляют собой

15 следующее:

«ЛОГИЧЕСКИЙ ЭЛЕМЕНТ ИЛИ» - Т-клетка запускается, когда антиген А или антиген В присутствует на клетке-мишени

«ЛОГИЧЕСКИЙ ЭЛЕМЕНТ И» - Т-клетка запускается только когда оба антигена А и В присутствуют на клетке-мишени

20 «ЛОГИЧЕСКИЙ ЭЛЕМЕНТ И НЕ» - Т-клетка запускается, если только антиген А присутствует на клетке-мишени, но не если оба антигена А и В присутствуют на клетке-мишени

Сконструированные Т-клетки, экспрессирующие эти комбинации CAR, можно адаптировать так, чтобы они обладали узкой специфичностью к клеткам

25 злокачественной опухоли на основании их конкретной экспрессии (или отсутствия экспрессии) двух или более маркеров.

Таким образом, в первом аспекте настоящее изобретение предусматривает клетку, которая совместно экспрессирует первый химерный антигенный рецептор (CAR) и второй CAR на клеточной поверхности, каждый CAR содержит:

30 (i) антигенсвязывающий домен;

(ii) спейсер

(iii) трансмембранный домен; и

(iv) внутриклеточный домен Т-клеточной сигнализации (эндодомен)

в которых антигенсвязывающие домены первого и второго CAR связываются с

35 различными антигенами и в которых спейсер первого CAR отличается от спейсера второго CAR, так что первый и второй CAR не образуют гетеродимеры, и в которых

один из первого или второго CAR представляет собой активирующий CAR, который содержит активирующий внутриклеточный домен Т-клеточной сигнализации, и другой CAR представляет собой ингибирующий CAR, который содержит «выключаемый

40 лигированием» (как определено в настоящем документе) ингибирующий внутриклеточный домен Т-клеточной сигнализации.

Клетка может представлять собой иммунную эффекторную клетку, такую как Т-клетка или естественная киллерная клетка (NK). Признаки, отмеченные в настоящем документе применительно к Т-клетке, применимы в равной мере к другим иммунным

45 эффекторным клеткам, таким как естественные киллерные клетки.

Спейсер первого CAR может иметь длину и/или заряд и/или геометрическую форму и/или конфигурацию и/или гликозилирование, отличающиеся от спейсера второго CAR, так что когда первый CAR и второй CAR связывают соответствующие им антигены-

мишени, первый CAR и второй CAR становятся пространственно разделенными на Т-клетке. Лигирование первого и второго CAR с соответствующими им антигенами вызывает их компартментализацию вместе или отдельно в иммунологическом синапсе, что ведет к управлению активацией. Это можно понять, рассмотрев модель

5 кинетического разделения активации Т-клеток (см. далее).

Первый спейсер или второй спейсер может содержать «стебель» CD8 и другой спейсер может содержать домен шарнира, CH2 и CH3 из IgG1.

В настоящем изобретении, которое относится к логическому элементу «И», один из первого или второго CAR представляет собой активирующий CAR, который содержит

10 активирующий эндодомен, и другой CAR представляет собой «выключаемый лигированием» ингибирующий CAR, который содержит ингибирующий эндодомен. Выключаемый лигированием ингибирующий CAR ингибирует активацию Т-клеток с помощью активирующего CAR в отсутствие лигирования ингибирующего CAR, но не значительно ингибирует активацию Т-клеток с помощью активирующего CAR, когда

15 ингибирующий CAR лигирован. Поскольку спейсер первого CAR имеет длину и/или заряд и/или геометрическую форму и/или конфигурацию и/или гликозилирование, отличающееся от спейсера второго CAR, когда оба CAR лигированы, они сегрегируются. Это вызывает пространственное отделение ингибирующего CAR от активирующего CAR с тем, чтобы могла происходить активация Т-клетки. Следовательно, активация

20 Т-клеток происходит только в ответ на клетку-мишень, несущую оба когнатных антигена.

Ингибирующий эндодомен может содержать весь или часть эндодомена из рецептороподобной тирозиновой фосфатазы, такой как CD148 или CD45.

Антигенсвязывающий домен первого CAR может связывать CD5 и

25 антигенсвязывающий домен второго CAR может связывать CD19. Это имеет применение при направленном воздействии на хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL). Это заболевание можно лечить посредством направленного воздействия только на CD19, но за счет истощения всего В-клеточного компартмента. CLL клетки отличаются тем, что они совместно экспрессируют CD5 и CD19. Направленное воздействие на эту пару

30 антигенов с использованием логического элемента И будет увеличивать специфичность и снижать токсичность.

Во втором аспекте настоящее изобретение предусматривает последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует как первый, так и второй химерные антигенные рецепторы (CAR), как определено в первом аспекте изобретения.

35 Соответственно, последовательность нуклеиновой кислоты может иметь следующую структуру: AgB1-спейсер1-TM1-эндо1-коэкспр-AgB2-спейсер2-TM2-эндо2, в которой

AgB1 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует антигенсвязывающий домен первого CAR;

40 спейсер1 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует спейсер первого CAR;

TM1 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует трансмембранный домен первого CAR;

эндо1 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая

45 кодирует эндодомен первого CAR;

коэкспр представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая допускает коэкспрессию двух CAR (например, сайт расщепления);

AgB2 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая

кодирует антигенсвязывающий домен второго CAR;

спейсер2 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует спейсер второго CAR;

5 TM2 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует трансмембранный домен второго CAR;

эндо2 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует эндодомен второго CAR;

10 эта последовательность нуклеиновой кислоты, при экспрессии в Т-клетке, кодирует полипептид, который расщепляют в сайте расщепления так, что первый и второй CAR совместно экспрессируют на поверхности Т-клеток.

Последовательность нуклеиновой кислоты, допускающая коэкспрессию двух CAR, может кодировать саморасщепляющийся пептид или последовательность, которая допускает альтернативное средство коэкспрессирующих двух CAR, таких как внутренняя последовательность связывания рибосомы или второй промотор или другое такое
15 средство, посредством которого специалист в данной области может экспрессировать два белка с одного и того же вектора.

Альтернативные кодоны можно использовать в областях последовательности, кодирующих одинаковые или схожие аминокислотные последовательности, во избежание гомологичной рекомбинации.

20 В третьем аспекте настоящее изобретение предусматривает набор, который содержит (i) первую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует первый химерный антигенный рецептор (CAR), как определено в первом аспекте изобретения, эта последовательность нуклеиновой кислоты имеет следующую структуру:

AgB1-спейсер1-TM1-эндо1

25 в которой

AgB1 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует антигенсвязывающий домен первого CAR;

спейсер1 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует спейсер первого CAR;

30 TM1 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует трансмембранный домен первого CAR;

эндо1 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует эндодомен первого CAR; и

35 (ii) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует второй химерный антигенный рецептор (CAR), как определено в первом аспекте изобретения, эта последовательность нуклеиновой кислоты имеет следующую структуру:

AgB2-спейсер2-TM2-эндо2

AgB2 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует антигенсвязывающий домен второго CAR;

40 спейсер2 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует спейсер второго CAR;

TM2 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует трансмембранный домен второго CAR;

45 эндо2 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует эндодомен второго CAR.

В четвертом аспекте настоящее изобретение предусматривает набор, который содержит: первый вектор, который содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, как определено выше; и второй вектор, который содержит первую

последовательность нуклеиновой кислоты, как определено выше.

Векторы могут представлять собой плазмидные векторы, ретровирусные векторы или транспозонные векторы. Векторы могут представлять собой лентивирусные векторы.

5 В пятом аспекте настоящее изобретение предусматривает вектор, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно второму аспекту изобретения. Вектор может представлять собой лентивирусный вектор.

Вектор может представлять собой плазмидный вектор, ретровирусный вектор или транспозонный вектор.

10 В шестом аспекте настоящее изобретение включает коэкспрессию больше чем двух CAR таким образом, что на клетке-мишени можно распознавать комплексный паттерн больше чем из двух антигенов.

В седьмом аспекте настоящее изобретение предусматривает способ получения Т-клетки согласно первому аспекту изобретения, который включает стадию введения 15 одной или нескольких последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих первый и второй CAR; или одного или нескольких векторов, как определено выше, в Т-клетку.

Т-клетка может быть из образца, выделенного у пациента, родственного или неродственного донора гематопоезического трансплантата, полностью несвязанного донора, из пуповинной крови, дифференцирована из эмбриональной клеточной линии, 20 дифференцирована из индуцибельной линии клеток-предшественников или получена из трансформированной линии Т-клеток.

В восьмом аспекте настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, которая содержит множество Т-клеток в соответствии с первым аспектом изобретения.

25 В девятом аспекте настоящее изобретение предусматривает способ лечения и/или предотвращения заболевания, который включает стадию введения субъекту фармацевтической композиции в соответствии с восьмым аспектом изобретения.

Способ может включать следующие стадии:

- (i) выделение Т-клетки, как перечислено выше.
- 30 (ii) трансдукция или трансфекция Т-клеток одной или несколькими последовательностями нуклеиновой кислоты, которые кодируют первый и второй CAR, или одним или несколькими векторами, которые содержат такую последовательность (последовательности) нуклеиновой кислоты; и
- (iii) введение Т-клеток из (ii) субъекту.

35 Заболевание может представлять собой злокачественную опухоль.

В десятом аспекте настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию в соответствии с восьмым аспектом изобретения для использования в лечении и/или предотвращении заболевания.

Заболевание может представлять собой злокачественную опухоль.

40 В одиннадцатом аспекте настоящее изобретение предусматривает использование Т-клетки в соответствии с первым аспектом изобретения при изготовлении лекарственного средства для лечения и/или предотвращения заболевания.

Заболевание может представлять собой злокачественную опухоль.

Настоящее изобретение также относится к последовательности нуклеиновой кислоты, 45 которая содержит:

- а) первую нуклеотидную последовательность, которая кодирует первый химерный антигенный рецептор (CAR);
- б) вторую нуклеотидную последовательность, которая кодирует второй CAR;

с) последовательность, которая кодирует саморасщепляющийся пептид расположенный между первой и второй нуклеотидными последовательностями, так что два CAR экспрессируют в виде отдельных объектов.

Альтернативные кодоны можно использовать в одной или нескольких частях первой и второй нуклеотидных последовательностях в областях, которые кодируют одинаковые или схожие аминокислотные последовательности.

Настоящее изобретение также относится к вектору и клетке, которые содержат такую нуклеиновую кислоту.

Логический элемент И на основе кинетической сегрегации по настоящему изобретению дает значительное техническое преимущество относительно ранее описанных «совместных CAR», т. е. подход двойного направленного воздействия, в котором два антигена распознаются двумя CAR, которые подают или активирующий или костимулирующий сигнал Т-клетке.

При использовании подхода с совместными CAR, несмотря на то, что наибольшую активность можно ожидать в отношении клеток-мишеней, несущих оба антигена, можно ожидать существенную активность в отношении тканей, несущих только антиген, распознаваемый с помощью активирующего CAR. Можно ожидать, что эта активность должна быть по меньшей мере таковой CAR первого поколения. CAR первого поколения приводили к существенной токсичности: например, билиарную токсичность наблюдали при клиническом тестировании CAR первого поколения, распознающего карбоангидразу IX, которая неожиданно была экспрессирована на билиарном эпителии (ссылка на Rotterdam). Стоит отметить, что терминально дифференцированные эффекторы не требуют или не отвечают на костимуляторные сигналы, так что любые терминально дифференцированные CAR Т-клетки будут действовать максимально, несмотря на отсутствие костимуляторного CAR сигнала.

Кроме того, костимуляторные сигналы ведут к длительным эффектам, оказываемым на популяцию Т-клеток. Эти эффекты длятся дольше, чем взаимодействие в синапсе Т-клетка/мишень. Следовательно, CAR Т-клетки, которые становятся полностью активированными в опухоли и мигрируют, могут иметь максимально высокую активность в отношении нормальных тканей, несущих один антиген. Этот эффект «выхода за пределы» может быть наиболее выражен в тканях внутри или вблизи опухоли или в которые дренируется опухоль. Фактически, предложены и тестированы стратегии на основании концепции активности CAR первого поколения, усиливающейся костимуляторными сигналами, не связаны с CAR активацией, но опосредованы отдельным рецептором (Rossig, Blood. 2002 Mar 15;99(6):2009-16.).

Таким образом, можно ожидать, что подход с совместными CAR даст в лучшем случае снижение, но не устранение токсичности в отношении нормальной ткани, экспрессирующей одиночный антиген. В настоящем изобретении используют кинетическую сегрегацию в иммунологическом синапсе, образованном между Т-клеткой и клеткой-мишенью, чтобы регулировать запуск самой Т-клетки. Следовательно, достигают абсолютно строгого контроля запуска в отсутствие второго антигена. Таким образом, вся активация Т-клеток ограничена клетками-мишенями, экспрессирующими оба антигена, логический элемент И должен функционировать независимо от типа эффекторной клетки или состояния дифференциации и невозможен эффект выхода логического элемента И за пределы активации Т-клеток.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение также относится к аспектам, перечисленным в следующих номерных абзацах:

1. Т-клетка, которая совместно экспрессирует первый химерный антигенный рецептор (CAR) и второй CAR на клеточной поверхности, каждый CAR содержит:

- (i) антигенсвязывающий домен;
- (ii) спейсер;
- 5 (iii) трансмембранный домен; и
- (iv) эндодомен

в которых антигенсвязывающие домены первого и второго CAR связываются с различными антигенами, в которых спейсер первого CAR отличается от спейсера второго CAR и в которых один из первого или второго CAR представляет собой активизирующий CAR, который содержит активизирующий эндодомен, и другой CAR представляет собой или активизирующий CAR, который содержит активизирующий эндодомен, или ингибирующий CAR, который содержит выключаемый лигированием или выключаемый лигированием ингибирующий эндодомен.

2. Т-клетка в соответствии с п. 1, в которой спейсер первого CAR имеет длину и/или заряд и/или размер и/или конфигурацию и/или гликозилирование, отличающиеся от спейсера второго CAR, так что когда первый CAR и второй CAR связывают соответствующие им антигены-мишени, первый CAR и второй CAR становятся пространственно разделенными на мембране Т-клетки.

3. Т-клетка в соответствии с п. 2, в которой или первый спейсер или второй спейсер содержит «стебель» CD8 и другой спейсер содержит домен шарнира, CH2 и CH3 из IgG1.

4. Т-клетка в соответствии с п. 1, в которой как первый, так и второй CAR представляют собой активизирующие CAR.

5. Т-клетка в соответствии с п. 4, в которой один CAR связывает CD19 и другой CAR связывает CD20.

6. Т-клетка в соответствии с п. 2 или 3, в которой один из первого или второго CAR представляет собой активизирующий CAR, который содержит активизирующий эндодомен, и другой CAR представляет собой ингибирующий CAR, который содержит выключаемый лигированием ингибирующий эндодомен, этот ингибирующий CAR ингибирует активацию Т-клеток с помощью активизирующего CAR в отсутствие лигирования ингибирующего CAR, но не значительно ингибирует активацию Т-клеток с помощью активизирующего CAR, когда ингибирующий CAR лигирован.

7. Т-клетка в соответствии с п. 6, в которой ингибирующий эндодомен содержит весь эндодомен из CD148 или CD45 или его часть.

8. Т-клетка в соответствии с п. 6 или 7, в которой антигенсвязывающий домен первого CAR связывает CD5 и антигенсвязывающий домен второго CAR связывает CD19.

9. Т-клетка в соответствии с п. 1, в которой первый и второй спейсеры достаточно различны с тем, чтобы предотвращать образование перекрестных пар первого и второго CAR, но достаточно схожи, чтобы это приводило к совместной локализации первого и второго CAR после лигирования.

10. Т-клетка в соответствии с п. 9, в которой один из первого или второго CAR представляет собой активизирующий CAR, который содержит активизирующий эндодомен, и другой CAR представляет собой ингибирующий CAR, который содержит выключаемый лигированием ингибирующий эндодомен, этот ингибирующий CAR не значительно ингибирует активацию Т-клеток с помощью активизирующего CAR в отсутствие лигирования ингибирующего CAR, но ингибирует активацию Т-клеток с помощью активизирующего CAR, когда ингибирующий CAR лигирован.

11. Т-клетка в соответствии с п. 10, в которой выключаемый лигированием ингибирующий эндодомен содержит по меньшей мере часть фосфатазы.

12. Т-клетка в соответствии с п. 11, в которой включаемый лигированием ингибирующий эндодомен содержит весь RTPN6 или его часть.

13. Т-клетка в соответствии с п. 10, в которой включаемый лигированием ингибирующий эндодомен содержит по меньшей мере один ITIM-домен.

5 14. Т-клетка в соответствии с п. 13, в которой активность включаемого лигированием ингибирующего эндодомена усиливают посредством коэкспрессии слитного белка RTPN6-CD45 или -CD148.

15. Т-клетка в соответствии с любым из пп. с 10 до 14, в которой CAR, который содержит активирующий эндодомен, содержит антигенсвязывающий домен, который
10 связывает CD33, и CAR, который содержит включаемый лигированием ингибирующий эндодомен, содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD34.

16. Т-клетка, которая содержит больше чем два CAR, как определено в предшествующих пп., так что ее специфично стимулирует клетка, такая как Т-клетка, несущая отличающий паттерн больше чем из двух антигенов.

15 17. Последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует как первый, так и второй химерные антигенные рецепторы (CAR), как определено в любом из пп. с 1 до 16.

18. Последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с п. 17, которая имеет следующую структуру:

20 AgB1-спейсер1-TM1-эндо1-коэкспр-AbB2-спейсер2-TM2-эндо2
в которой

AgB1 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует антигенсвязывающий домен первого CAR;

спейсер1 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая
25 кодирует спейсер первого CAR;

TM1 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует трансмембранный домен первого CAR;

эндо1 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует эндодомен первого CAR;

30 коэкспр представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая делает возможной коэкспрессию обоих CAR

AgB2 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует антигенсвязывающий домен второго CAR;

спейсер2 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая
35 кодирует спейсер второго CAR;

TM2 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует трансмембранный домен второго CAR;

эндо2 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует эндодомен второго CAR;

40 эта последовательность нуклеиновой кислоты, когда ее экспрессируют в Т-клетке, кодирует полипептид, который расщепляют в сайте расщепления так, что на поверхности Т-клеток совместно экспрессируют первый и второй CAR.

19. Последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с п. 18, в которой коэкспр кодирует последовательность, которая содержит саморасщепляющийся пептид.

45 20. Последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с п. 18 или 19, в которой альтернативные кодоны используют в областях последовательности, которая кодирует одинаковые или схожие аминокислотные последовательности, во избежание гомологичной рекомбинации.

21. Набор, который содержит

(i) первую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует первый химерный антигенный рецептор (CAR), как определено в любом из пп. с 1 до 16, эта последовательность нуклеиновой кислоты имеет следующую структуру:

AgB1-спейсер1-TM1-эндо1

в которой

AgB1 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует антигенсвязывающий домен первого CAR;

спейсер1 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует спейсер первого CAR;

TM1 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует трансмембранный домен первого CAR;

эндо1 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует эндодомен первого CAR; и

(ii) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует второй химерный антигенный рецептор (CAR), как определено в любом из пп. с 1 до 16, эта последовательность нуклеиновой кислоты имеет следующую структуру:

AgB2-спейсер2-TM2-эндо2

AgB2 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует антигенсвязывающий домен второго CAR;

спейсер2 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует спейсер второго CAR;

TM2 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует трансмембранный домен второго CAR;

эндо2 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует эндодомен второго CAR.

22. Набор, который содержит: первый вектор, который содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, как определено в п. 21; и второй вектор, который содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, как определено в п. 21.

23. Набор в соответствии с п. 22, в котором векторы представляют собой интегрирующие вирусные векторы или транспозоны.

24. Вектор, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из пп. с 17 до 20.

25. Ретровирусный вектор или лентивирусный вектор или транспозон в соответствии с п. 24.

26. Способ получения Т-клетки в соответствии с любым из пп. с 1 до 16, который включает стадию введения: последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из пп. с 17 до 20; первой последовательности нуклеиновой кислоты и второй последовательности нуклеиновой кислоты, как определено в п. 21; и/или первого вектора и второго вектора, как определено в п. 22, или вектора в соответствии с п. 24 или 25 в Т-клетку.

27. Способ в соответствии с п. 24, в котором Т-клетка происходит из образца, выделенного у субъекта.

28. Фармацевтическая композиция, которая содержит множество Т-клеток в соответствии с любым из пп. с 1 до 16.

29. Способ лечения и/или предотвращения заболевания, который включает стадию введения фармацевтической композиции в соответствии с п. 28 субъекту.

30. Способ в соответствии с п. 29, который включает следующие стадии:

(i) выделение образца, содержащего Т-клетки, у субъекта;

(ii) трансдукция или трансфекция Т-клеток с использованием: последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из пп. с 17 до 20; первой последовательности нуклеиновой кислоты и второй последовательности нуклеиновой кислоты, как определено в п. 21; первого вектора и второго вектора, как определено в п. 22 или 23, или вектора в соответствии с п. 24 или 25; и

(iii) введение Т-клеток из (ii) субъекту.

31. Способ в соответствии с п. 29 или 30, в котором заболевание представляет собой злокачественную опухоль.

32. Фармацевтическая композиция в соответствии с п. 28 для использования в лечении и/или предотвращении заболевания.

33. Использование Т-клетки в соответствии с любым из пп. с 1 до 16 при изготовлении лекарственного средства для лечения и/или предотвращения заболевания.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ (CAR)

CAR, которые схематически представлены на фиг. 1, представляют собой химерные трансмембранные белки I типа, которые соединяют внеклеточный антигенраспознающий домен (связывающее средство) с внутриклеточным сигнальным доменом (эндодомен).

Связывающее средство типично представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), полученный из моноклонального антитела (mAb), но оно может быть основано на других форматах, которые содержат антителоподобный антигенсвязывающий участок. Спейсерный домен обычно необходим для того, чтобы отделять связывающее средство от мембраны и сделать возможной его подходящую ориентацию. Обыкновенный используемый спейсерный домен представляет собой Fc из IgG1. Может быть достаточно более компактного спейсера, например, «стебля» из CD8α и даже просто только шарнира IgG1, в зависимости от антигена. Трансмембранный домен заякоривает белок в клеточной мембране и соединяет спейсер с эндодоменом.

Ранние конструкции CAR содержали эндодомены, полученные из внутриклеточных частей или γ цепи из FcεR1 или CD3ξ. Следовательно, эти рецепторы первого поколения передавали иммунологический сигнал 1, которого было достаточно для того, чтобы запускать уничтожение Т-клетками когнатных клеток-мишеней, но не достаточно для того, чтобы полностью активировать Т-клетку для пролиферации и выживания. Чтобы преодолеть это ограничение, сконструированы составные эндодомены: слияние внутриклеточной части из костимуляторной молекулы Т-клетки с таковой из CD3ξ дает рецепторы второго поколения, которые могут передавать активирующий и костимуляторный сигнал одновременно после распознавания антигена. Наиболее широко используют костимуляторный домен из CD28. Это обеспечивает наиболее сильный костимуляторный сигнал, а именно, иммунологический сигнал 2, который запускает Т-клеточную пролиферацию. Также описаны некоторые рецепторы, которые содержат эндодомены семейства рецепторов TNF, такие как близкородственные OX40 и 41BB, которые передают сигналы выживания. Сейчас даже описаны еще более сильные CAR третьего поколения, которые имеют эндодомены, способные передавать сигналы активации, пролиферации и выживания.

Кодирующие CAR нуклеиновые кислоты можно переносить в Т-клетки с использованием, например, ретровирусных векторов. Можно использовать лентивирусные векторы. Таким образом, большое число Т-клеток со специфичностью к злокачественной опухоли можно создавать для адоптивного переноса клеток. Когда

CAR связывает антиген-мишень, это ведет к передаче активирующего сигнала в Т-клетку, на которой он экспрессирован. Таким образом CAR определяет специфичность и цитотоксичность Т-клетки в направлении опухолевых клеток, которые экспрессируют антиген-мишень.

Первый аспект изобретения относится к Т-клетке, которая совместно экспрессирует первый CAR и второй CAR так, что Т-клетка может распознавать желаемый паттерн экспрессии на клетках-мишенях наподобие логического элемента, как подробно изложено в таблицах истинности: таблица 1, 2 и 3.

И первый и второй (и необязательно последующие) CAR содержат:

- (i) антигенсвязывающий домен;
- (ii) спейсер;
- (iii) трансмембранный домен; и
- (iii) внутриклеточный домен.

Таблица 1 Таблица истинности для CAR логического элемента ИЛИ		
Антиген А	Антиген В	Ответ
Отсутствует	Отсутствует	Нет активации
Отсутствует	Присутствует	Активация
Присутствует	Отсутствует	Активация
Присутствует	Присутствует	Активация

Таблица 2 Таблица истинности для CAR логического элемента И		
Антиген А	Антиген В	Ответ
Отсутствует	Отсутствует	Нет активации
Отсутствует	Присутствует	Нет активации
Присутствует	Отсутствует	Нет активации
Присутствует	Присутствует	Активация

Таблица 3 Таблица истинности для CAR логического элемента И НЕ		
Антиген А	Антиген В	Ответ
Отсутствует	Отсутствует	Нет активации
Отсутствует	Присутствует	Нет активации
Присутствует	Отсутствует	Активация
Присутствует	Присутствует	Нет активации

Первый и второй CAR Т-клетки по настоящему изобретению можно получать в виде полипептида, который содержит оба CAR, вместе с сайтом расщепления.

В SEQ ID № с 1 до 5 приведены примеры таких полипептидов, каждый из которых содержит два CAR. Следовательно, CAR может содержать одну или другую часть следующих аминокислотных последовательностей, которые соответствуют одному CAR.

SEQ ID № 1 представляет собой CAR логический элемент ИЛИ, который распознает CD19 ИЛИ CD33

SEQ ID № 2 представляет собой CAR логический элемент И, который распознает CD19 И CD33 с использованием фосфатазы CD148

SEQ ID № 3 представляет собой альтернативную реализацию CAR логического элемента И, который распознает CD19 И CD33, который использует фосфатазу CD45

SEQ ID № 4 представляет собой CAR логический элемент И НЕ, который распознает CD19 И НЕ CD33 на основании фосфатазы PTPN6

SEQ ID № 5 представляет собой альтернативную реализацию CAR логического

элемента И НЕ, который распознает CD19 И НЕ CD33 и основан на ITIM-содержащем эндодомене из LAIR1

SEQ ID № 6 представляет собой дополнительную альтернативную реализацию CAR логического элемента И НЕ, который распознает CD19 И НЕ CD33 и рекрутирует слитный белок PTPN6-CD148 в эндодомен, содержащий ITIM.

SEQ ID № 1

MSLPVTALLPLALLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQ
QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTF
GGGKLEITKAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGV
SLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGSSETTYYNALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQ
TDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIFWVLVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRRVKFSRS
ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ
KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRAEGRGSL
LTCGDVEENPGPMAVPTQVLGLLLLWLTDAACDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASE
DIYFNLVWYQQKPGKAPKLLIYDTNRLADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYY
CQHYKNYPLTFGQGTKEIKRSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSRSEVQLVESGGGLVQP
GGSLRLSCAASGFTLSNYGMHWIRQAPGKGLEWVSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISR
NAKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAQDAYTGGYFDYWGQGTILTVSSMDPAEPKSP
DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIAARTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV
LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKFWVL
VVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD
VLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGL
YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID № 2

MSLPVTALLPLALLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQ
QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTF
GGGKLEITKAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGV
SLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGSSETTYYNALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQ
TDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIFWVLVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRRVKFSRS
ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ
KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRAEGRGSL
LTCGDVEENPGPMAVPTQVLGLLLLWLTDAACDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASE
DIYFNLVWYQQKPGKAPKLLIYDTNRLADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYY
CQHYKNYPLTFGQGTKEIKRSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSRSEVQLVESGGGLVQP
GGSLRLSCAASGFTLSNYGMHWIRQAPGKGLEWVSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISR
NAKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAQDAYTGGYFDYWGQGTILTVSSMDPAEPKSP
DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIAARTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV
LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKAVFG
CIFGALVIVTVGGFIFWRKKRKDAKNNEVSFSQIKPKKSKLIRVENFEAYFKKQQADSNC
GFAEEYEDLKLVGISQPKYAAELAENRGKNRYNNVLPYDISRVKLSVQTHSTDDYINAN
YMPGYHKKDFIATQGPLPNTLKDFWRMVWEKNVYAIIMLTKEVEQGRTKCEEYWPS
KQAQDYGDIIVAMTSEIVLPEWTIRDFTVKNIQTSESHPLRQFHFTSWPDHGVPTDLDL

INFRLVRDYMKQSPPEPILVHCSAGVGRTGTIFAIDRLIYQIENENTVDVYGIVYDLRM
HRPLMVQTEDQYVFLNQCVLDIRSQKDSKVDLIYQNTTAMTIYENLAPVTTFGKTNG
YIA

SEQ ID № 3

5 MSLPVTALLPLALLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQ
QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTF
GGGKLEITKAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGV
SLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQ
TDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
10 PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIFWVLVVGGVLACYSLVTVAFIIFWVRRVKFSRS
ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ
KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRRAEGRGSL
LTCGDVEENPGPMAVPTQVLGLLLLWLTARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASE
DIYFNLVWYQQKPGKAPKLLIYDTNRLADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYY
15 CQHYKNYPLTFGQGTKEIKRSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSRSEVQLVESGGGLVQP
GGSLRLSCAASGFTLSNYGMHWIRQAPGKGLEWVSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISR
NAKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAQDAYTGGYFDYWGQGTILTVSSMDPAEPKSP
DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
20 AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKALIA
FLAFLIIVTSIALLVLYKIYDLHKRSCNLDEQQELVERDDEKQLMNVEPIHADILLETY
KRKIADEGRFLAEFQSIPRVFSKFPIKEARKPFNQKNRYVDILPYDYNRVELSEINGDA
GSNYINASYIDGFKEPRKYIAAQGPRDETVDDFWRMIWEQKATVIVMVTRCEEGRNKK
25 CAEYWPSMEEGTRAFGDVVVKINQHKRCPDYIIQKLNIVNKKKEKATGREVTHIQFTSWP
DHGVPEDPHLLLKLRRRVNAFSNFFSGPIVHCSAGVGRTGTIYIGIDAMLEGLEAENKV
DVYGYVVKLRRQRCLMVQVEAQYILIHQALVEYNQFGETEVNLSLHPYLHNMMKKRD
PPSESPLEAEFQRLPSYRSWRTQHIGNQEENKSKNRNSNVIPYDYNRVPLKHELEMSKE
SEHDSDESSDDSDSEEPSKYINASFIMSYWKPEVMIAAQGPLKETIGDFWQMIFQRKV
30 KVIVMLTELKHGDQEICAQYWGEKGQTYGDIEVDLKDSDKSTYTLRVFELRHSKRKD
SRTVYQYQYTNWSVEQLPAEPKELISMIQVVKQKLPQKNSSEGNKHHKSTPLLIHCRDG
SQQTGIFCALLNLESAETEEVDIFQVVKALRKARPGMVSTFEQYQFLYDVIASSTYPAQ
NGQVKKNNHQEDKIEFDNEVDKVKQDANCVNPLGAPEKLPEAKEQAEGSEPTSGTEGP
EHSVNGPASPALNQGS

35 SEQ ID № 4

MSLPVTALLPLALLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQ
QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTF
GGGKLEITKAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGV
SLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQ
40 TDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIFWVLVVGGVLACYSLVTVAFIIFWVRRVKFSRS
ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ
KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRRAEGRGSL
LTCGDVEENPGPMAVPTQVLGLLLLWLTARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASE
45 DIYFNLVWYQQKPGKAPKLLIYDTNRLADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYY
CQHYKNYPLTFGQGTKEIKRSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSRSEVQLVESGGGLVQP
GGSLRLSCAASGFTLSNYGMHWIRQAPGKGLEWVSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISR
NAKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAQDAYTGGYFDYWGQGTILTVSSMDPATTTKP

VLRTSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDIYWAPLAGICVALLLSLIITLIC
YHRSRKRVCKSGGGSFWEEFESLQKQEVKNLHQRLEGQRPENKGNRYKNILPFDHSR
VILQGRDSNIPGSDYINANYIKNQLLGPDENAKTYIASQGCLEATVNDFWQMAWQENS
RVIVMTTREVVEKGRNKCVPYWPEVGMQRAYGPYSVTNCGEHDTTTEYKLRTLQVSPLD
5 NGDLIREIWHYQYLSWPDHGVSEPGGVLSFLDQINQRQESLPHAGPIIVHCSAGIGRTG
TIIVIDMLMENISTKGLDCDIDIQKTIQMVRAQRSGMVQTEAQYKFIYVAIAQFIETTKK
KL

SEQ ID № 5

MSLPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQ
10 QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTF
GGGKLEITKAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGV
SLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGSSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQ
TDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIFWVLVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRRVKFSRS
15 ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ
KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRRAEGRGSL
LTCGDVEENPGPMAVPTQVLGLLLLWLTDARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASE
DIYFNLVWYQQKPGKAPKLLIYDTNRLADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYY
CQHYKNYPLTFGQGTKLEIKRSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSRSEVQLVESGGGLVQP
20 GGSRLSLSAASGFTLSNYGMHWIRQAPGKGLEWVSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISR
NAKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAQDAYTGGYFDYWGQGTTLTVSSMDPATTTKP
VLRTSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDILIGVSVVFLFCLLLLVFLCLHR
QNQIKQGPPRSKDEEQKPQQRPD LAVDLERTADKATVNGLPEKDRETDTSALAAGSS
QEVTYAQLDHWALTQRTARAVSPQSTKPMASITYAAVARH

SEQ ID № 6

MSLPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQ
QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTF
GGGKLEITKAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGV
SLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGSSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQ
30 TDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIFWVLVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRRVKFSRS
ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ
KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRRAEGRGSL
LTCGDVEENPGPMAVPTQVLGLLLLWLTDARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASE
35 DIYFNLVWYQQKPGKAPKLLIYDTNRLADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYY
CQHYKNYPLTFGQGTKLEIKRSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSRSEVQLVESGGGLVQP
GGSRLSLSAASGFTLSNYGMHWIRQAPGKGLEWVSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISR
NAKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAQDAYTGGYFDYWGQGTTLTVSSMDPATTTKP
VLRTSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDILIGVSVVFLFCLLLLVFLCLHR
40 QNQIKQGPPRSKDEEQKPQQRPD LAVDLERTADKATVNGLPEKDRETDTSALAAGSS
QEVTYAQLDHWALTQRTARAVSPQSTKPMASITYAAVARHRAEGRGSL LTCGDVEE
NPGPWYHGHMSGGAETLLQAKGEPWTFILVRESLSQPGDFVLSVLSQPKAGPGSPLR
VTHIKVMCEGGRYTVGGLETFDLVEHFKKTGIEEASGAFVYLRQPYSGGGGSFEA
YFKKQQAADSNCGFAEEYEDLKLVGISQPKYAAELAENRGKNRYNNVLPYDISRVKLSV
45 QTHSTDDYINANYMPGYHKKDFIATQGPLPNTLKDFWRMVWEKNVYAIIMLT KCVE
QGRTKCEEYWPSKQAQDYGDITVAMTSEIVLPEWTIRDFTVKNIQTSESHPLRQFHFTS
WPDHGVPTD TDLINFRYLV RDYMKQSPPEPILVHCSAGVGRGTGTFIAIDRLIYQIENEN
TVDVYGIVYDLRMHRPLMVQTEDQYVFLNQCVLDIRSQKDSKVDLIYQNTTAMTIYE

NLAPVTTFGKTINGYIASGS

CAR может содержать вариант CAR-кодирующей части последовательности, представленной в качестве SEQ ID № 1, 2, 3, 4, 5 или 6, которая имеет по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентичность последовательностей, при условии, что вариант последовательности представляет собой CAR, который обладает необходимыми свойствами.

Способы выравнивания последовательностей хорошо известны в данной области, и их реализуют с использованием подходящих программ для выравнивания. Процент идентичности последовательностей относится к процентной доле остатков аминокислот или нуклеотид, которые идентичны в двух последовательностях, когда они выровнены оптимально. Гомологию или идентичность нуклеотидных и белковых последовательностей можно определять с использованием стандартных алгоритмов, таких как программа BLAST (Basic Local Alignment Search Tool в National Center for Biotechnology Information) с параметрами по умолчанию, которая общедоступна на <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. Другие алгоритмы для определения идентичности или гомологии последовательностей включают: LALIGN (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/lalign/> и <http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/lalign/nucleotide.html>), AMAS (Analysis of Multiply Aligned Sequences, <http://www.compbio.dundee.ac.uk/Software/Amas/amas.html>), FASTA (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/>), Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), SIM (<http://web.expasy.org/sim/>) и EMBOSS Needle (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html).

CAR ЛОГИЧЕСКИЙ ЭЛЕМЕНТ ИЛИ

В этом варианте осуществления антигенсвязывающие домены первого и второго CAR по настоящему изобретению связываются с различными антигенами, и оба CAR содержат активирующий эндодомен. Оба CAR имеют различные спейсерные домены для того, чтобы предотвращать образование перекрестных пар из двух различных рецепторов. Таким образом, можно конструировать Т-клетки для того, чтобы активация происходила при распознавании любого или обоих антигенов. Это можно использовать в области онкологии, как показан в гипотезе Goldie-Coldman: одиночное направленное воздействие на один антиген может вести к ускользанию опухоли посредством модуляции указанного антигена из-за высокой частоты мутаций, свойственной большинству злокачественных опухолей. Посредством одновременного направленного воздействия на два антигена вероятность такого ускользания снижается экспоненциально.

Известны различные опухоль-ассоциированные антигены, как показано в следующей таблице 4. Для данного заболевания первый CAR и второй CAR может связываться с двумя различными ТАА, связанными с этим заболеванием. Таким образом, предотвращено ускользание опухоли посредством модуляции одного антигена, поскольку на второй антиген также воздействуют направленно. Например, при направленном воздействии на В-клеточное злокачественное новообразование, можно одновременно направленно воздействовать на CD19 и CD20. В этом варианте осуществления важно, что два CAR не образуют гетеродимеров.

ТАБЛИЦА 4

Тип злокачественно опухоли	ТАА
Диффузная В-крупноклеточная лимфома	CD19, CD20
Злокачественная опухоль молочной железы	ErbB2, MUC1
AML	CD13, CD33
Нейробластома	GD2, NCAM
B-CLL	CD19, CD52
Злокачественная опухоль толстой кишки	Фолатсвязывающий белок, CA-125

МОДЕЛЬ КИНЕТИЧЕСКОЙ СЕГРЕГАЦИИ

Последующее образование пар CAR для создания логического элемента И и логического элемента И НЕ основано на модели кинетической сегрегации (KS) активации Т-клеток. Она представляет собой функциональную модель, подтвержденную экспериментальными данными, которая объясняет, как распознавание антигена Т-клеточным рецептором превращается в нисходящие сигналы активации. В кратком изложении: в основном состоянии сигнальные компоненты на мембране Т-клетки находятся в динамическом гомеостазе, за счет чего дефосфорилированные ITAM предпочтительнее фосфорилированных ITAM. Это обусловлено более высокой активностью трансмембранного CD45/фосфатазы CD148, чем у киназ, связанных с мембраной, таких как Lck. Когда Т-клетка связывается с клеткой-мишенью через распознавание когнатного антигена Т-клеточным рецептором (или CAR), образуются плотные иммунологические синапсы. Такое тесное расположение Т-клетки и мембран-мишеней исключает CD45/CD148 из-за их больших эктодоменов, которые не могут поместиться в синапсе. Сегрегация высокой концентрации ассоциированных с Т-клеточным рецептором ITAM и киназ в синапсе, в отсутствие фосфатазы, ведет к состоянию, в котором предпочтительны фосфорилированные ITAM. ZAP70 распознает порог фосфорилированных ITAM и распространяет сигнал активации Т-клеток. Это глубокое понимание активации Т-клеток используют в настоящем изобретении. В частности, изобретение основано на этом понимании того, как эктодомены с различной длиной и/или объемом и/или зарядом и/или конфигурацией и/или гликозилированием ведут к дифференциальной сегрегации при формировании синапса.

CAR ЛОГИЧЕСКИЙ ЭЛЕМЕНТ И

В этом варианте осуществления один CAR содержит активирующий эндодомен и один CAR содержит ингибирующий эндодомен, посредством чего ингибирующий CAR конститутивно ингибирует первый активирующий CAR, но при распознавании своего когнатного антигена, снимает свое ингибирование активирующего CAR. Таким образом, можно конструировать Т-клетку для запуска, только если клетка-мишень экспрессирует оба когнатных антигена. Этого поведения достигают с помощью активирующего CAR, который содержит активирующий эндодомен, содержащий ITAM-домены, например эндодомен CD3 дзета, и ингибирующего CAR, который содержит эндодомен из фосфатазы, способный дефосфорилировать ITAM (например, CD45 или CD148). Самое главное, спейсерные домены обоих CAR значительно отличаются по размеру и/или геометрической форме и/или заряду и т.д. Когда лигирован только активирующий CAR, ингибирующий CAR находится в растворе на поверхности Т-клетки и может диффундировать в и из синапса, ингибируя активирующий CAR. Когда лигированы оба CAR, из-за различий в свойствах спейсера, активирующий и ингибирующий CAR дифференциально сегрегированы, что позволяет активирующему CAR запускать активацию Т-клеток без пространственного затруднения со стороны ингибирующего CAR.

Это обладает существенной полезностью в области терапии злокачественных опухолей. В настоящее время иммунотерапия типично направлена на один антиген. Большинство злокачественных опухолей нельзя отличить от нормальных тканей на основании одного антигена. Таким образом, имеет место существенная токсичность «в мишени вне опухоли», за счет которой при терапии происходит повреждение нормальных тканей. Например, при направленном воздействии на CD20 для того, чтобы лечить В-клеточные лимфомы ритуксимабом, происходит истощение всего компартмента нормальных В-клеток. Например, при направленном воздействии на

CD52 для того, чтобы лечить хронический лимфоцитарный лейкоз, происходит истощение всего лимфоидного компартмента. Например, при направленном воздействии на CD33 для того, чтобы лечить острый миелолейкоз, происходит истощение всего миелоидного компартмента и т.д. С помощью ограничения активности парой антигенов можно разработать значительно более точное направленное воздействие и, таким образом, менее токсичную терапию. Практическим примером является направленное воздействие на CLL, который экспрессирует и CD5 и CD19. Только небольшая доля нормальных В-клеток экспрессирует оба антигена, так что токсичность вне мишени при направленном воздействии на оба антигена с использованием логического элемента И по существу меньше, чем индивидуальное направленное воздействие на каждый антиген.

Конструкция по настоящему изобретению представляет собой существенное усовершенствование предыдущей реализации, как описано у Wilkie et al. ((2012). J. Clin. Immunol. 32, 1059-1070) и затем протестировано in vivo (Kloss et al (2013) Nat. Biotechnol. 31, 71-75). В этой реализации первый CAR содержит активирующий эндодомен, а второй - костимуляторный домен. Таким образом, Т-клетка получает только активирующий и костимуляторный сигнал, когда присутствуют оба антигена. Однако Т-клетка все же будет активировать в присутствии только первого антигена, что ведет к возможной токсичности вне мишени. Кроме того, реализация по настоящему изобретению допускает множественные составные сцепленные логические элементы, посредством которых клетка может интерпретировать комплексный паттерн антигенов.

ТАБЛИЦА 5	
Тип злокачественной опухоли	Антигены
Хронический лимфоцитарный лейкоз	CD5, CD19
Нейробластома	ALK, GD2
Глиома	EGFR, виментин
Множественная миелома	BCMA, CD138
Почечноклеточная карцинома	Карбоангидраза IX, G250
T-ALL	CD2, N-кадгерин
Злокачественная опухоль предстательной железы	PSMA, гепсин (или другие)

CAR ЛОГИЧЕСКИЙ ЭЛЕМЕНТ И НЕ

В этом варианте осуществления один CAR содержит активирующий эндодомен и один CAR содержит ингибирующий эндодомен так, что этот ингибирующий CAR активен только когда он распознает свой когнатный антиген. Таким образом, Т-клетка, сконструированная таким образом, активируется в ответ на присутствие только первого антигена, но не активируется, когда присутствуют оба антигена. Это изобретение реализовано с помощью ингибирующих CAR со спейсером, который может быть локализован совместно с первым CAR, но или фосфатазная активность ингибирующего CAR не должна быть настолько высокой, чтобы он ингибировал в растворе, или ингибирующий эндодомен фактически рекрутирует фосфатазу только когда ингибирующий CAR распознает свою когнатную мишень. В настоящем документе такие эндодомены называют «включаемыми лигированием» или полуингибирующими.

Это изобретение полезно для уточнения направленного воздействия, когда опухоль можно отличать от нормальной ткани по присутствию опухоли-ассоциированного антигена и утрате антигена, экспрессированного на нормальной ткани. Логический элемент И НЕ обладает существенной полезностью в области онкологии, поскольку он делает возможным направленное воздействие на антиген, который экспрессирует нормальная клетка, эта нормальная клетка также экспрессирует антиген,

распознаваемый с помощью CAR, который содержит активирующий эндодомен. Примером такого антигена является CD33, который экспрессируют нормальные стволовые клетки и клетки острого миелолейкоза (AML). CD34 экспрессируют стволовые клетки, но типично не экспрессируют клетки AML. Т-клетка, распознающая CD33 И НЕ CD34, будет вести к разрушению клеток лейкоза, но беречь нормальные стволовые клетки.

Возможные пары антигенов для использования с логическими элементами И НЕ приведены в таблице 6.

ТАБЛИЦА 6

Заболевание	ТАА	Нормальная клетка, которая экспрессирует ТАА	Антиген, экспрессируемый нормальной клеткой, но не клеткой злокачественной опухоли
AML	CD33	Стволовые клетки	CD34
Миелома	BCMA	Дендритные клетки	CD1c
B-CLL	CD160	Естественные киллерные клетки	CD56
Злокачественная опухоль предстательной железы	PSMA	Нервная ткань	NCAM
Злокачественная опухоль кишечника	A33	Нормальный кишечник	I класс HLA

СОСТАВНЫЕ ЛОГИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ

Модель кинетической сегрегации с вышеуказанными компонентами допускает создание составных логических элементов, например, Т-клетку, которая запускается в ответ на паттерны из больше чем двух антигенов-мишеней. Например, возможно создать Т-клетку, которая запускается только когда присутствуют три антигена (А И В И С). Здесь клетка экспрессирует три CAR, каждый распознает антигены А, В и С. Один CAR является возбуждающим, а два являются ингибирующими, где каждый CAR имеет спейсерные домены, которые ведут к дифференциальной сегрегации. Только когда все три лигированы, Т-клетка будет активна. Дополнительный пример: (А ИЛИ В) И С: здесь CAR, распознающие антигены А и В, являются активирующими и имеют спейсеры которые могут быть совместно локализованы, тогда как CAR, распознающий антиген С, является ингибирующим и имеет спейсер, результатом чего является другая совместная сегрегация. Дополнительный пример (А И НЕ В) И С: здесь CAR против антигена А имеет активирующий эндодомен и совместно локализован с CAR против антигена В, который имеет эндодомен, ингибирующий при определенных условиях. CAR против антигена С имеет спейсер, который сегрегируется отлично от А или В, и является ингибирующим. Фактически, с использованием этих простых компонентов по изобретению и любого числа CAR и спейсеров можно программировать даже более сложную булеву логику.

СИГНАЛЬНЫЙ ПЕПТИД

CAR Т-клетки по настоящему изобретению могут содержать сигнальный пептид с тем, чтобы когда CAR экспрессируют внутри клетки, такой как Т-клетка, направлять появляющийся белок на эндоплазматический ретикулум и впоследствии на клеточную поверхность, где он будет экспрессирован.

Сердцевина сигнального пептида может содержать длинный участок гидрофобных аминокислот, который имеет склонность к формированию одной альфа-спирали. Сигнальный пептид может начинаться коротким положительно заряженным участком аминокислот, который помогает укреплять надлежащую топологию полипептида во время транслокации. На конце сигнального пептида типично имеет место участок аминокислот, которые распознает и отщепляет сигнальная пептидаза. Сигнальная пептидаза может осуществлять отщепление или во время транслокации или по ее

завершении, чтобы создавать свободный сигнальный пептид и зрелый белок. После этого специфичные протеазы расщепляют свободные сигнальные пептиды.

Сигнальный пептид может находиться на amino-конце молекулы.

Сигнальный пептид может содержать SEQ ID № 7, 8 или 9 или их вариант, который имеет 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотную мутацию (инсерцию, замену или вставку) при условии, что сигнальный пептид все еще функционирует, обеспечивая экспрессию CAR на клеточной поверхности.

SEQ ID № 7: MGTSLLCWMALCLLGADHADG

Сигнальный пептид SEQ ID № 7 является компактным и высоко эффективным.

Предсказано, что он дает расщепление приблизительно 95% после конечного глицина, давая эффективное удаление сигнальной пептидазой.

SEQ ID № 8: MSLPVTALLPLALLLHAARP

Сигнальный пептид SEQ ID № 8 получают из IgG1.

SEQ ID № 9: MAVPTQVLGLLLLWLTDARC

Сигнальный пептид SEQ ID № 9 получают из CD8.

Сигнальный пептид для первого CAR может иметь последовательность, отличную от сигнального пептида из второго CAR (и от третьего CAR и четвертого CAR и т. п.).

АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЙ ДОМЕН

Антигенсвязывающий домен представляет собой часть CAR, которая распознает антиген. Многие антигенсвязывающие домены известны в данной области, в том числе те, которые основаны на антигенсвязывающем участке антитела, миметике антитела и Т-клеточных рецепторах. Например, антигенсвязывающий домен может содержать: одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), полученный из моноклонального антитела; природный лиганд антигена-мишени; пептид с достаточной аффинностью к мишени; однодоменное антитело; искусственное одиночное связывающее средство, такое как Darpin (сконструированный белок с анкириновым повтором); или одна цепь, полученная из Т-клеточного рецептора.

Антигенсвязывающий домен может содержать домен, который не основан на антигенсвязывающем участке антитела. Например, антигенсвязывающий домен может содержать домен на основании белка/пептида, который представляет собой растворимый лиганд для рецептора клеточной поверхности опухоли (например, растворимый пептид, такой как цитокин или хемокин); или внеклеточный домен лиганда или рецептора, заякоренного в мембране, для которого вторая часть пары связывания экспрессирована на опухолевой клетке.

Примеры с 11 до 13 относятся к CAR, который связывает BCMA, в котором антигенсвязывающий домен содержит APRIL, лиганд для BCMA.

Антигенсвязывающий домен может быть основан на природном лиганде антигена.

Антигенсвязывающий домен может содержать аффинный пептид из комбинаторной библиотеки или сконструированный de novo аффинный белок/пептид.

СПЕЙСЕРНЫЙ ДОМЕН

CAR содержит спейсерную последовательность для соединения антигенсвязывающего домена с трансмембранным доменом и пространственного отделения антигенсвязывающего домена от эндодомена. Гибкий спейсер позволяет антигенсвязывающему домену ориентироваться в различных направлениях для того, чтобы содействовать связыванию.

В Т-клетке по настоящему изобретению первый и второй CAR содержат различные спейсерные молекулы. Например, спейсерная последовательность, например, может содержать Fc-область IgG1, шарнир IgG1 или «стебель» CD8 человека или «стебель»

CD8 мыши. Спейсер альтернативно может содержать альтернативную линкерную последовательность, которая имеет схожую длину и/или свойства разнесения доменов, как у Fc-области IgG1, шарнира IgG1 или «стебля» CD8. Спейсер IgG1 человека можно изменять для того, чтобы удалять мотивы связывания Fc.

5 Примеры аминокислотных последовательностей для этих спейсеров приведены ниже:
SEQ ID № 10 (шарнир-CH2CH3 из IgG1 человека)

AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
10 NYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
KD

SEQ ID № 11 («стебель» CD8 человека):

TTTPAPRPPTPARTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI

SEQ ID № 12 (шарнир IgG1 человека):

15 AEPKSPDKTHTCPPCPKDPK

SEQ ID № 13 (эктодомен CD2)

KEITNALETWGALGQDINLDIPSFQMSDDIDDIKWEKTSDDKKIAQFRKEKETFKDKD
TYKLFKNGTLKIKHLKTDDQDIYKVSIDYDTKGKNVLEKIFDLKIQERVSKPKISWTCINT
TLTCEVMNGTDPELNLYQDGKHLKLSQRVITHKWTTSLSAKFKCTAGNKVSKESSVER
20 VSCPEKGLD

SEQ ID № 14 (эктодомен CD34)

SLDNNGTATPELPTQGTFSNVSTNVSYQETTPSTLGSTSLHPVSQHGNEATTNITETT
VKFTSTSVITSVYGNTNSSVQSQTSTVFTTPANVSTPETTLKPSLSPGNVSDLSTTSTS
LATSPTKPYTSSSPILSDIKAEIKCSGIREVKLTQGICLEQNKTSSCAEFKKDRGEGLARVL
25 CGEEQADADAGAQVCSLLLAQSEVRPQCLLLVLNRTEISSKLQLMKKHQSDLKKLGI
LDFTEQDVASHQSYSQKT

Поскольку CAR типично представляют собой гомодимеры (см. фиг. 1a), перекрестное образование пар может вести к гетеродимерному химерному антигенному рецептору. Это нежелательно по различным причинам, например: (1) эпитоп может не быть на
30 том же «уровне» на клетке-мишени, так что перекрестно-спаренный CAR может быть способен только связываться с одним антигеном; (2) VH и VL из двух различных scFv могут меняться местами и оказываться неспособными распознавать мишень или, хуже того, распознавать неожиданный и непредсказуемый антиген. Для логического элемента «ИЛИ» и логического элемента «И НЕ» спейсер первого CAR достаточно отличен от
35 спейсера второго CAR во избежание образования перекрестных пар. Аминокислотная последовательность первого спейсера может иметь меньше чем 50%, 40%, 30% или 20% идентичности со вторым спейсером на аминокислотном уровне.

В других аспектах изобретения (например, логический элемент И) важно, что спейсер первого CAR имеет отличающуюся длину и/или заряд и/или геометрическую форму и/
40 или конфигурацию и/или гликозилирование, так что когда первый и второй CAR связывают свой антиген-мишень, различия в заряде или размерах спейсера ведет к пространственному разделению CAR двух типов на различные части мембраны, чтобы приводить к активации, как предсказано с помощью модели кинетического разделения. В этих аспектах отличающуюся длину, геометрическую форму и/или конфигурацию
45 спейсеров осторожно выбирают, принимая во внимание размер и связывающий эпитоп на антигене-мишени для того, чтобы сделать возможным дифференциальную сегрегацию при распознавании когнатной мишени. Например, предположительно шарнир IgG1, «стебель» CD8, Fc из IgG1, эктодомен CD34, эктодомен CD45 способны к

дифференциальной сегрегации.

Примеры пар спейсеров, которые способны к дифференциальной сегрегации и, следовательно, пригодны для использования с логическим элементом И, представлены в следующей таблице:

Спейсер стимулирующего CAR	Спейсер ингибирующего CAR
CD8STK человека	Шарнир-CH2CH3 из IgG человека
Эктодомен CD3z человека	Шарнир-CH2CH3 из IgG человека
Шарнир IgG человека	Шарнир-CH2CH3 из IgG человека
CD28STK человека	Шарнир-CH2CH3 из IgG человека
CD8STK человека	Шарнир-CH2CH3CD4 из IgM человека
Эктодомен CD3z человека	Шарнир-CH2CH3CD4 из IgM человека
Шарнир IgG человека	Шарнир-CH2CH3CD4 из IgM человека
CD28STK человека	Шарнир-CH2CH3CD4 из IgM человека

В других аспектах изобретения (например, логический элемент И НЕ) важно, чтобы спейсер достаточно отличался для того, чтобы предотвращать образование перекрестных пар, но был достаточно схожим для совместной локализации. Можно использовать пары ортологичных спейсерных последовательностей. Примерами являются «стебли» CD8 мыши и человека или альтернативно спейсерные домены, которые являются мономерными, например, эктодомен CD2.

Примеры пар спейсеров, которые совместно локализуются и, следовательно, пригодны для использования с логическим элементом И НЕ, представлены в следующей таблице:

Спейсер стимулирующего CAR	Спейсер ингибирующего CAR
CD8aSTK человека	CD8aSTK мыши
CD28STK человека	CD8aSTK мыши
Шарнир IgG человека	Эктодомен CD3z человека
CD8aSTK человека	CD28STK мыши
CD28STK человека	CD28STK мыши
Шарнир-CH2CH3 из IgG человека	Шарнир-CH2CH3CD4 из IgM человека

Все указанные выше спейсерные домены формируют гомодимеры. Однако механизм не ограничен использованием гомодимерных рецепторов и будет работать с мономерными рецепторами до тех пор, пока спейсер является достаточно жестким. Примером такого спейсера является CD2 или усеченный CD22.

ТРАНСМЕМБРАННЫЙ ДОМЕН

Трансмембранный домен представляет собой последовательность CAR, которая пронизывает мембрану.

Трансмембранный домен может представлять собой любую белковую структуру, которая термодинамически стабильна в мембране. Типично она представляет собой альфа-спираль, которая содержит несколько гидрофобных остатков. Трансмембранный домен любого трансмембранного белка можно использовать для предоставления трансмембранной части по изобретению. Присутствие и размер трансмембранного домена белка могут определять специалисты в данной области с использованием алгоритма ТМНММ (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ТМНММ-2.0/>). Кроме того, учитывая, что трансмембранный домен белка представляет собой относительно простую структуру, т. е. полипептидная последовательность, согласно прогнозу, может формировать гидрофобную альфа-спираль достаточной длины, чтобы пронизывать мембрану, также можно использовать искусственно сконструированный ТМ домен (в US 7052906 B1 описаны синтетические трансмембранные компоненты).

Трансмембранный домен можно получать из CD28, который дает хорошую стабильность рецепторов.

АКТИВИРУЮЩИЙ ЭНДОДОМЕН

Эндодомен представляет собой передающую сигналы часть CAR. После распознавания антигена, рецепторы образуют кластер, нативные CD45 и CD148 исключены из синапса и сигнал передается в клетку. Наиболее широко используемый эндодоменным компонентом является таковой из CD3-дзета, который содержит 3 ITAM. Он передает активационный сигнал в Т-клетку после связывания антигена. CD3-дзета может не предоставлять полностью достаточный активационный сигнал и может быть необходима передача дополнительных костимуляторных сигналов. Например, химерный CD28 и OX40 можно использовать с CD3-дзета для того, чтобы передавать пролиферативный сигнал/сигнал выживания, или можно использовать вместе все три.

Когда Т-клетка по настоящему изобретению содержит CAR с активирующим эндодоменом, он может содержать только эндодомен CD3-дзета, эндодомен CD3-дзета с таковым из любого из CD28 или OX40 или эндодомен CD28 и OX40 и эндодомен CD3-дзета.

Любой эндодомен, который содержит мотив ITAM, в этом изобретении может действовать в качестве активационного эндодомена. Известно, что некоторые белки содержат эндодомены с одним или несколькими мотивами ITAM. Примеры таких белков, среди прочего, включают эпсилон-цепь CD3, гамма-цепь CD3 и дельта-цепь CD3. Мотив ITAM можно легко распознавать как тирозин, отделенный от лейцина или изолейцина какими-либо двумя другими аминокислотами, дающими сигнатуру YxxL/I. Типично, но не всегда, два из этих мотивов разделены 6-8 аминокислотами в хвосте молекулы (YxxL/Ix(6-8)YxxL/I). Таким образом, специалист в данной области может легко найти существующие белки, которые содержат один или несколько ITAM, чтобы передавать активационный сигнал. Кроме того, данный мотив является простым, и сложная вторичная структура не требуется, специалист в данной области может конструировать полипептиды, содержащие искусственные ITAM для того, чтобы передавать активационн* сигнал (см. WO 2000063372, которая относится к синтетическим сигнальным молекулам).

Т-клеточный трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домен (эндодомен) в CAR с активирующим эндодоменом может содержать последовательность, представленную как SEQ ID № 15, 16 или 17 или ее вариант, который имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательностей.

SEQ ID № 15, содержащая трансмембранный домен CD28 и эндодомен CD3 Z
FWVLVVGGVLACYSLVTVAFIIFWVRRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR
REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID № 16, содержащая трансмембранный домен CD28 и эндодомены CD28 и CD3-дзета

FWVLVVGGVLACYSLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYP
YAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM
GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYD
ALHMQALPPR

SEQ ID № 17, содержащая трансмембранный домен CD28 и эндодомены CD28, OX40 и CD3-дзета.

FWVLVVGGVLACYSLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYP
YAPPRDFAAYSRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPA

YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA
EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Вариант последовательности может иметь по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности последовательностей с SEQ ID № 15, 16 или 17, при условии, что последовательность предусматривает эффективный трансмембранный домен и эффективный внутриклеточный домен Т-клеточной сигнализации.

«ВЫКЛЮЧАЕМЫЙ ЛИГИРОВАНИЕМ» ИНГИБИРУЮЩИЙ ЭНДОДОМЕН

В варианте осуществления, указанном выше в качестве логического элемента И, один из CAR содержит ингибирующий эндодомен так, что ингибирующий CAR ингибирует активацию Т-клеток с помощью активирующего CAR в отсутствие лигирования ингибирующего CAR, но не значительно ингибирует активацию Т-клеток с помощью активирующего CAR, когда ингибирующий CAR лигирован. Это называют «выключаемым лигированием» ингибирующим эндодоменом.

В этом случае, спейсер ингибирующего CAR имеет длину, заряд, геометрическую форму и/или конфигурацию и/или гликозилирование, отличающиеся от спейсера активирующего CAR, так что когда оба рецептора лигированы, различия в размерах спейсеров ведут к выделению активирующих CAR и ингибирующих CAR в различные мембранные компартменты иммунологического синапса с тем, чтобы снять ингибирование активирующего эндодомена ингибирующим эндодоменом.

Следовательно, ингибирующие эндодомены для использования в выключаемом лигировании ингибирующем CAR могут содержать какую-либо последовательность, которая ингибирует Т-клеточную сигнализацию с помощью активирующего CAR, когда она находится в том же мембранном компартменте (т. е. в отсутствие антигена для ингибирующего CAR), но которая не значительно ингибирует Т-клеточную сигнализацию, когда она изолирована в отдельной части мембраны от ингибирующего CAR.

Выключаемый лигированием ингибирующий эндодомен может представлять собой или содержать тирозиновую фосфатазу, такую как рецептороподобная тирозиновая фосфатаза. Ингибирующий эндодомен может представлять собой или содержать любую тирозиновую фосфатазу, которая способна ингибировать передачу сигнала TCR, когда лигирован только стимулирующий рецептор. Ингибирующий эндодомен может представлять собой или содержать любую тирозиновую фосфатазу с достаточно высокой скоростью катализа для фосфорилированных ITAM, которая способна ингибировать передачу сигнала TCR, когда лигирован только стимулирующий рецептор.

Например, ингибирующий эндодомен логического элемента И может содержать эндодомен из CD148 или CD45. Показано, что CD148 и CD45 действует естественным путем на фосфорилированные тирозины выше по каскаду реакций от передачи сигнала TCR.

CD148 представляет собой рецептороподобную белковую тирозиновую фосфатазу, которая отрицательно регулирует передачу сигнала TCR посредством препятствования фосфорилированию и функционированию PLCγ1 и LAT.

CD45 присутствует на всех гематопоетических клетках, представляет собой белковую тирозиновую фосфатазу, которая способна регулировать сигнальную трансдукцию и функциональные реакции, также посредством фосфорилирования PLCγ1.

Ингибирующий эндодомен может содержать всю рецептороподобную тирозиновую фосфатазу или ее часть. Фосфатаза может препятствовать фосфорилированию и/или функционированию элементов, вовлеченных в передачу Т-клеточных сигналов, таких как PLCγ1 и/или LAT.

Трансмембранный и эндодомен из CD45 и CD148 представлены как SEQ ID № 18 и № 19, соответственно.

SEQ ID 18 - последовательность трансмембранного и эндодомена CD45

ALIAFLAFLIIVTSIALLVLYKIYDLHKKRSCNLDEQQEIVERDDEKQLMNVEPIHAD

5 ILLETYKRKIADEGRLFLAEFQSIPRVFSKFPIKEARKPFNQKNRYVDILPYDYNRVELS
EINGDAGSNYINASYIDGFKPRKYIAAQGPRDETVDDFWRMIWEQKATVIVMVTTRCEE
GNRNKCAEYWPSMEEGTRAFGDVVVKINQHKRCPDYIIQKLNIVNKKEKATGREVTHI
QFTSWPDHGVPEDPHLLLKLRRRVNAFSNFFSGPIVVHCSAGVGRTGTIYIGIDAMLEGL
EAENKVDVYGYVVKLRRQRCLMVQVEAQYILIHQALVEYNQFGETEVNLSELHPYLH
10 NMKKRDPPEPSPLEAEFQRLPSYRSWRTQHIGNQEENKSKNRNSNVIPYDYNRVPLKH
ELEMSKESEHDSDESSDDSDSEEPSKYINASFIMSYWKPEVMIAAQGPLKETIGDFWQ
MIFQRKVKVIVMLTELKHGDQEICAQYWGEKGQTYGDIEVDLKDSDKSSTYTLRVFEL
RHSKRKDSRTVYQYQYTNWSVEQLPAEPKELISMIQVVKQKLPQKNSSEGKNHHKSTP
LLIHCRDGSQQTGIFCALLNLLESAETEEVVDIFQVVKALRKARPGMVSTFEQYQFLYD
15 VIASTYPAQNGQVKKNNHQEDKIEFDNEVDKVKQDANCVNPLGAPEKLPEAKEQAEGS
EPTSGTEGPEHSVNGPASPALNQQS

SEQ ID 19 - последовательность трансмембранного и эндодомена CD148

AVFGCIFGALVIVTVGGFIFWRKKRDAKNNEVSFSQIKPKKSKLIRVENFEAYFKKQ

QADSNCGFAEEYEDLKLVGISQPKYAAELAENRGKNRYNNVLPYDISRVKLSVQTHST
20 DDYINANYMPGYHKKDFIATQGPLPNTLKDFFWRMVWEKNVYAIIMLTKCVEQGRTK
CEEYWPSKQAQDYGDITVAMTSEIVLPEWTIRDFTVKNIQTSSEHPLRQFHFTSWPDHG
VPDITDILLINFRYLVRDYMKQSPPEPILVHCSAGVGRTGTIFAIDRLIYQIENENTVDVY
GIVYDLRMHRPLMVQTEDQYVFLNQCVLDIRSQKDSKVDLIYQNTTAMTIYENLAPV
TTFGKTNGYIA

25 Ингибирующий CAR может содержать всю SEQ ID № 18 или 19 или ее часть (например, он может содержать фосфатазную функцию эндодомена). Он может содержать вариант последовательности или ее части, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательностей до тех пор, пока вариант сохраняет способность базово ингибировать передачу Т-клеточных сигналов с помощью активирующего CAR.

30 Другие спейсеры и эндодомены можно тестировать, например, с использованием модельной системы, проиллюстрированной в настоящем документе. Популяции клеток-мишеней можно создавать посредством трансдукции подходящей клеточной линии, такой как клеточная линия SupT1, или однократно или двукратно для того, чтобы создавать клетки, негативные по обоим антигенам (дикого типа), положительные по
35 любому и положительные по обоим (например CD19-CD33-, CD19+CD33-, CD19-CD33+ и CD19+CD33+). Т-клетки, такие как линия Т-клеток мыши BW5147, которые высвобождают IL-2 при активации, можно трансдуцировать парами CAR, и измерять их способность функционировать в логическом элементе через измерение высвобождения IL-2 (например, с помощью ELISA). Например, в примере 4 показано, что оба
40 эндодомена CD148 и CD45 могут выполнять функцию ингибирующих CAR в комбинации с активирующим CAR, содержащим дзета-эндодомен CD3. Эти CAR основаны на коротком/некрупном спейсере из «стебля» CD8 на одном CAR и крупном Fc спейсере на другом CAR, чтобы получать логическую функцию И. Когда оба рецептора лигированы, различие в размерах спейсеров ведет к выделению различных рецепторов
45 в различные мембранные компартменты, что снимает ингибирование рецептора CD3-дзета эндодоменами CD148 или CD45. Таким образом, активация возникает только когда активируют оба рецептора. Можно легко видеть, что эту модульную систему можно использовать для того, чтобы тестировать альтернативные пары спейсеров и

ингибирующих эндодоменов. Если спейсеры не достигают изоляции после лигирования обоих рецепторов, ингибирование не будет устранено и поэтому не произойдет активация. Если тестируемый ингибирующий эндодомен не эффективен, следует ожидать активации в присутствии лигирования активирующего CAR независимо от состояния лигирования ингибирующего CAR.

«ВКЛЮЧАЕМЫЙ ЛИГИРОВАНИЕМ» ЭНДОДОМЕН

В варианте осуществления, упомянутом выше в качестве логического элемента И НЕ, один из CAR содержит «включаемый лигированием» ингибирующий эндодомен так, что ингибирующий CAR не значительно ингибирует активацию Т-клеток с помощью активирующего CAR в отсутствие лигирования ингибирующего CAR, но ингибирует активацию Т-клеток с помощью активирующего CAR, когда ингибирующий CAR лигирован.

«Включаемый лигированием» ингибирующий эндодомен может представлять собой или содержать тирозиную фосфатазу, которая не способна ингибировать передачу сигнала TCR, когда лигирован только стимулирующий рецептор.

«Включаемый лигированием» ингибирующий эндодомен может представлять собой или содержать тирозиную фосфатазу с достаточно низкой скоростью катализа для фосфорилированных ITAM, которая не способна ингибировать передачу сигнала TCR, когда лигирован только стимулирующий рецептор, но она способна ингибировать ответ на передачу сигнала TCR, когда сконцентрирована в синапсе. Концентрация в синапс достигается через лигирование ингибирующего рецептора.

Если тирозинная фосфатаза имеет скорость катализа, которая слишком велика для «включаемого лигированием» ингибирующего эндодомена, то возможно снижать скорость катализа фосфатазы через модификацию, такую как точечные мутации и короткие линкеры (которые вызывают стерические затруднения), чтобы сделать ее подходящей для «включаемого лигированием» ингибирующего эндодомена.

В этом первом варианте осуществления эндодомен может представлять собой или содержать фосфатазу, которая значительно менее активна, чем CD45 или CD148, так что значимое дефосфорилирование ITAM возникает только когда активирующие и ингибирующие эндодомены совместно локализованы. В данной области известны многие подходящие последовательности. Например, ингибирующий эндодомен логического элемента И НЕ может содержать всю белковую тирозинную фосфатазу, такую как PTPN6, или ее часть.

Белковые тирозинные фосфатазы (PTP) представляют собой сигнальные молекулы, которые регулируют различные клеточные процессы, в том числе клеточный рост, дифференциацию, митотический цикл и онкогенная трансформация. N-концевая часть этой PTP содержит два tandemных гомологичных (SH2) домена Src, которые действуют в качестве белковых фосфотирозин-связывающих доменов и опосредуют взаимодействие этой PTP с ее субстратом. Эту PTP экспрессируют в первую очередь гематопозитические клетки, и она функционирует в качестве важного регулятора множества путей передачи сигналов в гематопозитических клетках.

Ингибирующий домен может содержать всю PTPN6 (SEQ ID № 20) или только фосфатазный домен (SEQ ID № 21).

SEQ ID 20 - последовательность PTPN6

MVRWFHRDLSGLDAETLLKGRGVHGSFLARPSRKNQGDFSLSVRVGDQVTHIRIQN
SGDFYDLYGGEKFATLTELVEYYTQQQGVQLQDRDGTIIHLKYPLNCS DPTSERWYHGH
MSGGQAETLLQAKGEPWTFVLVRESLSQPGDFVLSVLSQPKAGPGSPLRVTHIKVMCE
GGRYTVGGLETDFSLTDLVEHFKKTGIEEASGAFFVYLRQPYATRVNAADIENRVLELN

KKQSEDTAKAGFWEEFESLQKQEVKNLHQRLEGQRPENKGKNRYKNILPFDHSRVIL
QGRDSNIPGSDYINANYIKNQLLGPDENAKTYIASQGCLEATVNDFWQMAWQENSRVI
VMTTREVEKGRNKCVPYWPPEVGMQRAYGPYSVTNCGEHDTEYKLRTLQVSPLDNGD
LIREIWHYQYLSWPDHGVPEPGGVLSFLDQINQRQESLPHAGPIIVHCSAGIGRTGTIIVI
5 DMLMENISTKGLDCDIDIQKTIQMVRAQRSGMVQTEAQYKFIYVAIAQFIETTKKKLEV
LQSQKGQSEYGNITYPPAMKNAHAKASRTSSKHKEDVYENLHTKNKREEKVKKQRS
ADKEKSKGSLKRK

SEQ ID 21 - последовательность фосфатазного домена из PTPN6

FWEEFESLQKQEVKNLHQRLEGQRPENKGKNRYKNILPFDHSRVILQGRDSNIPGSD
10 YINANYIKNQLLGPDENAKTYIASQGCLEATVNDFWQMAWQENSRVIVMTTREVEKG
RNKCVPYWPPEVGMQRAYGPYSVTNCGEHDTEYKLRTLQVSPLDNGDLIREIWHYQY
LSWPDHGVPEPGGVLSFLDQINQRQESLPHAGPIIVHCSAGIGRTGTIIVIDMLMENISTK
GLDCDIDIQKTIQMVRAQRSGMVQTEAQYKFIYVAIAQF

Второй вариант осуществления включаемого лигированием ингибирующего
15 эндодомена представляет собой ITIM (иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий
мотив)-содержащий эндодомен, такой как таковой из CD22, LAIR-1, семейства
рецепторов подавления цитотоксичности (KIR), LILRB1, CTLA4, PD-1, BTLA и т.д.
Когда фосфорилированы, ITIM рекрутируют эндогенную PTPN6 через свой домен SH2.
При совместной локализации с ITAM-содержащим эндодоменом, происходит
20 дефосфорилирование и ингибирование активирующего CAR.

ITIM представляет собой консервативную последовательность аминокислот (S/I/V/
LxYxxI/V/L), которую находят в цитоплазматических хвостах многих ингибирующих
рецепторов иммунной системы. Специалист в данной области может легко найти
белковые домены, содержащие ITIM. Список вероятных ITIM-содержащих белков
25 человека создан посредством сканирования всего протеома (Staub, et al (2004) Cell.
Signal. 16, 435-456). Кроме того, поскольку хорошо известна консенсусная
последовательность и, по-видимому, необходима небольшая вторичная структура,
специалист в данной области может создавать искусственные ITIM.

ITIM-эндодомены из PDCD1, BTLA4, LILRB1, LAIR1, CTLA4, KIR2DL1, KIR2DL4,
30 KIR2DL5, KIR3DL1 и KIR3DL3 представлены в SEQ ID с 22 до 31, соответственно.

SEQ ID 22 эндодомен PDCD1

CSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEY
ATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL

SEQ ID 23 BTLA4

KLQRRWKRTQSQQGLQENSSGQSFFVRNKKVRRAPLSEGPLSLGHCYNPMMEDGISY
35 TTLRFPEMNIPRTGDAESSEMQRPPDCDDTVTYSALHKRQVGDYENVIPDFPEDEGIHY
SELIQFGVGERPQAQENVVILKH

SEQ ID 24 LILRB1

LRHRRQGKHWTSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEEENLYAAVK
40 HTQPEDGVEMDTRSPHDEDPQAVTYAEVKHSRPRREMASPPSPLSGEFLDTKDRQAE
DRQMDTEAAASEAPQDVITYAQLHSLTLRREATEPPPSQEGPSAVPSIYATLAIH

SEQ ID 25 LAIR1

HRQNQIKQGPPRSKDEEQKPQQRPD LAVDLERTADKATVNGLPKDRDRETDTSALA
AGSSQEVITYAQLDHWALTQRTARAVSPQSTKPMASITYAAVARH

45 SEQ ID 26 CTLA4

FLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKMLKKRSPLTTGVYVKMPPTPECEKQFQPYF
IPIN

SEQ ID 27 KIR2DL1

GNSRHLHVLIGTSVVIIPFAILLFFLLHRWCANKKNAVMDQEPAGNRTVNREDSDE
QDPQEVITYQLNHCVFTQQRKITRPSQRPKTPPTDIIIVYTELPNAESRSKVVS

SEQ ID 28 KIR2DL4

GIARHLHAVIRYSVAIILFTILPFFLLHRWCSKKKENAAVMNQEPAGHRTVNREDSDE
QDPQEVITYAQLDHCIFTQQRKITGPSQRSKRPSTDTSVCIELPNAEPRALSPAHEHHSQAL
MGSSRETTALSQTQLASSNVPAAGI

SEQ ID 29 KIR2DL5

TGIRRLHLILIGTSVAIILFIILFFLLHCCCSNKKNAAVMDQEPAGDRTVNREDSDDQ
DPQEVITYAQLDHCVFTQTKITSPSQRPKTPPTDTTMYMELPNAKPRSLSPAHKHHSQAL
RGSSRETTALSQNRVASSHVPAAGI

SEQ ID 30 KIR3DL1

KDPRHLHLIGTSVVIILFILLFFLLHLWCSNKKNAAVMDQEPAGNRTANSEDSDEQ
DPEEVITYAQLDHCVFTQQRKITRPSQRPKTPPTDTILYTELPNAKPRSKVVVS

SEQ ID 31 KIR3DL3

KDPGNSRHLHVLIGTSVVIIPFAILLFFLLHRWCANKKNAVMDQEPAGNRTVNRED
SDEQDPQEVITYAQLNHCVFTQQRKITRPSQRPKTPPTDTSV

Третий вариант осуществления включаемого лигированием ингибирующего
эндодомена представляет собой ITIM-содержащий эндодомен, совместно
экспрессируемый со слитным белком. Слитный белок может содержать по меньшей
мере часть белковой тирозиновой фосфатазы и по меньшей мере часть
рецептороподобной тирозиновой фосфатазы. Слитная конструкция может содержать
один или несколько доменов SH2 из белковой тирозиновой фосфатазы. Например,
слитная конструкция может быть между доменом SH2 PTPN6 и эндодоменом CD45 или
между доменом SH2 PTPN6 и эндодоменом CD148. Когда фосфорилированы, ITIM-
домены рекрутируют слитный белок, приводя высоко активную фосфатазу CD45 или
CD148 в непосредственную близость с активирующим эндодоменом, блокируя
активацию.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ слитных белков перечислены 32 и 33

SEQ ID 32 слитный белок PTPN6-CD45

WYHGHMSGGQAETLLQAKGEPWTFVLVRESLSQPGDFVLSVLSQPKAGPGSPLRVT
HIKVMCEGGRYTVGGLETFDLSLTDLVEHFKKTGIEEASGAFVYLRQPYKIYDLHKKRSC
NLDEQQEIVLRDDEKQLMNVEPIHADILLETYKRKIADEGRLFLAEFQSIPRVFSKFPKE
ARKPFNQKNRYVDILPYDYNRVELSEINGDAGSNYINASYIDGFKEPRKYIAAQGPRD
ETVDDFWRMWIEQKATVIVMVTRECEGNRNKCAEYWPSMEEGTRAFGDVVKINQH
KRCPTYIIQKLNIIVNKKKEKATGREVTHIQFTSWPDHGVPEDPHLLLKLRRRVNAFSNFFS
GPIVVHCSAGVGRTGTIYIGIDAMLEGLEAENKVDVYGYVVKLRRQRCLMVQVEAQYIL
IHQALVEYNQFGETEVNLSELHPYLHNMKKRDPPSEPSPLEAEFQRLPSYRSWRTQHIG
NQEENKSKNRNSNVIPYDYNRVLKHELEMSKESEHDSDESSDDSDSEEPSKYINASFIM
SYWKPEVMIAAQGPLKETIGDFMIQRKVIVMLTELKHGDQEICAQYWGEKGQTYG
DIEVDLKDSDKSSTYTLRVFELRHSKRKDSRTVYQYQYTNWSVEQLPAEPKELISMIQV
VKQKLPQKNSSEGKHHKSTPLLIHCRDGSQQTGIFCALLNLLESAETEEVVDIFQVVKAL
LRKARPGMVSTFEQYQFLYDVIASTYPAQNGQVKKNNHQEDKIEFDNEVDKVKQDAN
CVNPLGAPEKLPEAKEQAEGSEPTSGTEGPEHSVNGPASPALNQGS

SEQ ID 33 слитный белок PTPN6-CD148

ETLLQAKGEPWTFVLVRESLSQPGDFVLSVLSQPKAGPGSPLRVTHIKVMCEGGRYT
VGGLETFDLSLTDLVEHFKKTGIEEASGAFVYLRQPYRKKRKDAKNNNEVSFSQIKPKKSK
LIRVENFEAYFKKQQADSNCGFAEEYEDLKLIVGISQPKYAAELAENRGKNRYNNVLPY
DISRVKLSVQTHSTDDYINANYMPGYHKKDFIATQGPLPNTLKDFFWRMVWEKNVYAI

IMLTKCVEQGRTKCEEYWPSKQAQDYGDITVAMTSEIVLPEWTIRDFTVKNIQTSESHPLRQFHFTSWPDHGVPTDITLLINFRYLYRDMKQSPPEPILVHCSAGVGRGTGTFIAIDRLIYQIENENTVDVYGIVYDLRMHRPLMVQTEDQYVFLNQCVDIVRSQKDSKVDLIYQNTTAMTIYENLAPVTTFGKTNGYIA

- 5 Включаемый лигированием ингибирующий CAR может содержать всю SEQ ID № 20 или 21 или ее часть. Он может содержать всю SEQ ID с 22 до 31 или ее часть. Он может содержать всю SEQ ID с 22 до 31 или ее часть, совместно экспрессированную с любой SEQ ID 32 или 33. Он может содержать вариант последовательности или его часть, который имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательностей, до тех пор,
- 10 пока вариант сохраняет способность ингибировать Т-клеточную сигнализацию с помощью активирующего CAR при лигировании ингибирующего CAR.

- Как указано выше, альтернативные спейсеры и эндодомены можно тестировать, например, с использованием модельной системы, приведенной в качестве примера в настоящем документе. В примере 5 показано, что эндодомен PTPN6 может выполнять
- 15 функцию полуингибирующего CAR в комбинации с активирующим CAR, который содержит дзета-эндодомен CD3. Эти CAR основаны на спейсере из «стебля» CD8 человека на одном CAR и спейсере из «стебля» CD8 мыши на другом CAR. Ортологичные последовательности препятствуют образованию перекрестных пар. Однако, когда оба рецептора лигированы, сходство между спейсерами ведет к совместной сегрегации
- 20 различных рецепторов в одних и тех же мембранных компартментах. Это ведет к ингибированию CD3 дзета рецептора эндодоменом PTPN6. Если лигирован только активирующий CAR, эндодомен PTPN6 не достаточно активен для того, чтобы предотвращать активацию Т-клетки. Таким образом, активация происходит, если лигирован только активирующий CAR, а ингибирующий CAR не лигирован (логическая
- 25 функция И НЕ). Можно легко видеть, что модульную систему можно использовать для того, чтобы тестировать альтернативные пары спейсеров и ингибирующие домены. Если спейсеры не достигают совместной сегрегации после лигирования обоих рецепторов, ингибирование не будет эффективным и, таким образом, будет происходить активация. Если тестируемый полуингибирующий эндодомен неэффективен, следует
- 30 ожидать активации в присутствии лигирования активирующего CAR, независимо от состояния лигирования полуингибирующего CAR.

МЕСТО КОЭКСПРЕССИИ

Второй аспект изобретения относится к нуклеиновой кислоте, которая кодирует первый и второй CAR.

- 35 Нуклеиновая кислота может давать полипептид, который содержит две молекулы CAR, соединенные через сайт расщепления. Сайт расщепления может быть саморасщепляющимся, так что при получении полипептида, он незамедлительно расщепляется на первый и второй CAR без потребности в какой-либо внешней расщепляющей активности.
- 40 Известны различные саморасщепляющиеся сайты, в том числе саморасщепляющийся пептид 2а вируса ящура (FMDV), который имеет последовательность, представленную в качестве SEQ ID № 34:

SEQ ID № 34

RAEGRGSLTCDGVEENPGP

- 45 Коэкспрессирующая последовательность может представлять собой внутреннюю последовательность связывания рибосомы (IRES). Коэкспрессирующая последовательность может представлять собой внутренний промотор.

КЛЕТКА

Первый аспект изобретения относится к клетке, которая совместно экспрессирует первый CAR и второй CAR на клеточной поверхности.

Клетка может представлять собой какую-либо эукариотическую клетку, способную экспрессировать CAR на поверхности клетки, такой как иммунная клетка.

5 В частности, клетка может представлять собой иммунную эффекторную клетку, такую как Т-клетка или естественная киллерная (NK) клетка.

Т-клетки или Т-лимфоциты представляют собой тип лимфоцитов, который играет центральную роль в клеточно-опосредованном иммунитете. Их можно отличать от других лимфоцитов, таких как В-клетки и естественные киллерные клетки, с помощью
10 присутствия Т-клеточного рецептора (TCR) на клеточной поверхности. Существуют различные типы Т-клетки, как кратко изложено далее.

Т-хелперные клетки (ТН клетки) помогают другим белым клеткам крови в иммунологических процессах, в том числе в созревании В-клеток в плазматические клетки и В-клетки памяти и активации цитотоксических Т-клеток и макрофагов. На
15 своей поверхности ТН клетки экспрессируют CD4. Активация ТН клеток происходит, когда молекулы МНС II класса на поверхности антигенпредставляющих клеток (АПС) презентруют им пептидные антигены. Эти клетки можно отнести к одному из нескольких подтипов, в том числе ТН1, ТН2, ТН3, ТН17, Тн9 или TFH, которые секретируют различные цитокины для того, чтобы содействовать различными типам
20 иммунного ответа.

Цитотоксические Т-клетки (ТС клетки или CTL) уничтожают инфицированные вирусами клетки и опухолевые клетки, и также участвуют в отторжении трансплантата. CTL экспрессируют CD8 на своей поверхности. Эти клетки распознают свои мишени посредством связывания с антигеном, связанным с МНС I класса, который присутствует
25 на поверхности всех ядросодержащих клеток. Через IL-10, аденозин и другие молекулы, секретируемые регуляторными Т-клетками, CD8+ клетки можно инактивировать до анергического состояния, которое препятствует аутоиммунным заболеваниям, таким как экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит.

Т-клетки памяти представляют собой подмножество антигенспецифичных Т-клеток, которые персистируют длительное время после разрешения инфекции. Они быстро размножаются до большого числа эффекторных Т-клеток при повторном воздействии их когнатного антигена, таким образом обеспечивая «память» иммунной системы о
30 прошлых инфекциях. Т-клетки памяти содержат три подтипа: центральные Т-клетки памяти (TCM клетки) и два типа эффекторных Т-клеток памяти (TEM клетки и TEMRA клетки). Клетки памяти могут быть или CD4+ или CD8+. Т-клетки памяти типично экспрессируют белок клеточной поверхности CD45RO.

Регуляторные Т-клетки (клетки Treg), ранее известные как супрессорные Т-клетки, критически важны для поддержания иммунологической толерантности. Их основная роль состоит в том, чтобы переключать Т-клеточно-опосредованный иммунитет в
40 направлении окончания иммунной реакции и подавлять аутореактивные Т-клетки, которые избежали процесса негативной селекции в тимусе.

Описано два основных класса CD4+ клеток Treg - встречающиеся в природе клетки Treg и адаптивные клетки Treg.

Встречающиеся в природе клетки Treg (также известные как CD4+CD25+FoxP3+
45 клетки Treg) образуются в тимусе и связаны с взаимодействиями развивающихся Т-клеток как с миелоидными (CD11c+), так и с плазматоцитоподобными (CD123+) дендритными клетками, которые активированы с использованием TSLP. Встречающиеся в природе клетки Treg можно отличать от других Т-клеток по присутствию внутриклеточной

молекулы, называемой FoxP3. Мутации гена FOXP3 могут препятствовать развитию регуляторных Т-клеток, вызывая смертельное аутоиммунное заболевание IPeX.

Адаптивные клетки Treg (также известные как клетки Tr1 или клетки Th3) могут появляться во время нормального иммунного ответа.

5 Т-клетка по изобретению может относиться к любому из типов Т-клеток, которые указаны выше, в частности, к CTL.

Естественные киллерные (NK) клетки относятся к типу цитолитических клеток, которые образуют часть врожденной иммунной системы. Естественные киллерные клетки обеспечивают быстрый ответ на врожденный сигнал от инфицированных
10 вирусами клеток независимым от МНС образом.

Естественные киллерные клетки (относящиеся к группе врожденных лимфоидных клеток) определяют как большие гранулярные лимфоциты (LGL), который составляют третий тип клеток, дифференцированный от общего лимфоидного предшественника, образующего В- и Т-лимфоциты. Известно, что естественные киллерные клетки
15 дифференцируются и созревают в костном мозге, лимфатических узлах, селезенке, миндалинах и тимусе, где после этого они выходят в циркуляцию.

CAR клетки по изобретению могут относиться к любому указанному выше типу клеток.

CAR-экспрессирующие клетки, такие как CAR-экспрессирующие Т-клетки или
20 естественные киллерные клетки, можно или создавать *ex vivo* или брать из собственной периферической крови пациента (1-я сторона), или в условиях трансплантата гемопоэтических стволовых клеток из донорской периферической крови (2-я сторона) или периферической крови от неродственного донора (3-я сторона).

Настоящее изобретение также предусматривает клеточную композицию, которая
25 содержит CAR-экспрессирующие Т-клетки и/или CAR-экспрессирующие естественные киллерные клетки в соответствии с настоящим изобретением. Клеточную композицию можно создавать посредством трансдукции или трансфекции образца крови *ex vivo* с использованием нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением.

Альтернативно, CAR-экспрессирующие клетки можно получать путем
30 дифференциации *ex vivo* индуцибельных клеток-предшественников или эмбриональных клетл-предшественников в клетки релевантного типа, такие как Т-клетки. Альтернативно, можно использовать бессмертную клеточную линию, такую как линия Т-клеток, которая сохраняет свою литическую функцию и может действовать в качестве терапевтического средства.

35 Во всех этих вариантах осуществления CAR клетки получают посредством введения ДНК или РНК, кодирующих CAR, с помощью одного из множества средств, включая трансдукцию с использованием вирусного вектора, трансфекцию с использованием ДНК или РНК.

CAR Т-клетка по изобретению может представлять собой Т-клетку *ex vivo* от субъекта.
40 Т-клетка может быть из образца мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). Т-клетки можно активировать и/или размножать перед трансдукцией кодирующей CAR нуклеиновой кислотой, например, посредством обработки моноклональным антителом против CD3.

CAR Т-клетку по изобретению можно создавать путем:

45 (i) выделения содержащего Т-клетки образца у субъекта или из других источников, перечисленных выше; и

(ii) трансдукции или трансфекции Т-клеток одной или несколькими последовательностями нуклеиновых кислот, которые кодируют первый и второй CAR.

Затем Т-клетки можно очищать, например, отбирать на основании коэкспрессии первого и второго CAR.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Второй аспект изобретения относится к одной или нескольким последовательностям нуклеиновых кислот, которые кодируют первый CAR и второй CAR, как определено в первом аспекте изобретения.

Последовательность нуклеиновой кислоты может содержать одну из следующих последовательностей или ее вариант

SEQ ID 35 логический элемент ИЛИ

10 SEQ ID 36 логический элемент И с использованием CD45

SEQ ID 37 логический элемент И с использованием CD148

SEQ ID 38 логический элемент И НЕ с использованием PTPN6 в качестве эндодомена

SEQ ID 39 логический элемент И НЕ с использованием эндодомена LAIR1

15 и PTPN6 SH2 с фосфатазой CD148

SEQ ID № 35:

>MP13974.SFG.aCD19fmc63-CD8STK-CD28tmZ-2A-aCD33glx-HCH2CH3pvaa-CD28tmZw

ATGAGCCTGCCCCGTGACCGCCCTGCTGCTGCCCCCTGGCCCTGCTGCTGCACGCCG
CCAGACCAGACATCCAGATGACCCAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGC
20 GACCGGGTGACCATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTG
GTACCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCCGGC
TGCACAGCGGCGTGCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTACAGC
CTGACCATCAGCAACCTGGAGCAGGAGGACATCGCCACCTACTTCTGCCAGCAGGG
CAACACCCTGCCCTACACCTTCGGAGGCGGCACCAAGCTGGAGATCACCAAGGCCG
25 GAGGCGGAGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGG
CAGCGAGGTGAAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGCCTGGTGGCCCCAAGCCAGAGCC
TGAGCGTGACCTGCACCGTGAGCGGCGTGAGCCTGCCCCGACTACGGCGTGAGCTGG
ATCAGGCAGCCCCACGGAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGA
GACCACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACA
30 GCAAGAGCCAGGTGTTCCCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATC
TACTACTGCGCCAAGCACTACTACTATGGCGGCAGCTACGCTATGGACTACTGGGG
CCAGGGCACCAGCGTGACCGTGAGCTCAGATCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGAC
CACCAACACCGGCGCCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCG
TGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGA
35 TATCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGT
AACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAG
ACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGA
CGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGG
GGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAA
40 AGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGG
GGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTA
CGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCTCCTCGCAGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTC
TTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCCCGGGCCCATGGCCGTGCCCACTCAG
GTCCTGGGGTTGTTGCTACTGTGGCTTACAGATGCCAGATGTGACATCCAGATGACA
45 CAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGTCTGGAGATCGCGTCACCATCACCTGTCTGA
GCAAGTGAGGACATTTATTTTAATTTAGTGTGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGGC
CCCTAAGCTCCTGATCTATGATACAAATCGCTTGGCAGATGGGGTCCCATCACGGTT
CAGTGGCTCTGGATCTGGCACACAGTATACTCTAACCATAAGTAGCCTGCAACCCG

AAGATTTCGCAACCTATTATTGTCAACACTATAAGAATTATCCGCTCACGTTCCGGTC
 AGGGGACCAAGCTGGAAATCAAAAGATCTGGTGGCGGAGGGTCAGGAGGCGGAGG
 CAGCGGAGGCGGTGGCTCGGGAGGCGGAGGCTCGAGATCTGAGGTGCAGTTGGTG
 GAGTCTGGGGGCGGCTTGGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGGCTCTCCTGTGCAGC
 5 CTCAGGATTCACTCTCAGTAATTATGGCATGCACTGGATCAGGCAGGCTCCAGGGA
 AGGGTCTGGAGTGGGTCTCGTCTATTAGTCTTAATGGTGGTAGCACTTACTATCGAG
 ACTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGGGACAATGCAAAAAGCACCCCTCTAC
 CTTCAAATGAATAGTCTGAGGGCCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCAGCACA
 GGACGCTTATACGGGAGGTTACTTTGATTACTGGGGCCAAGGAACGCTGGTCACAG
 10 TCTCGTCTATGGATCCCGCCGAGCCCAAATCTCCTGACAAAACCTCACACATGCCCCAC
 CGTGCCCAGCACCTCCCGTGGCCGGCCCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCCCCAAAACCCA
 AGGACACCCCTCATGATCGCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTG
 AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA
 TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
 15 AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
 GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG
 GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACC
 AAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
 CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAACCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCC
 20 GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC
 AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCCCTGCACAA
 TCACTATACCCAGAAATCTCTGAGTCTGAGCCCAGGCAAGAAGGACCCCAAGTTCT
 GGGTCCTGGTGGTGGTGGGAGGCGTGCTGGCCTGTTACTCTCTCCTGGTGACCGTGG
 CCTTCATCATCTTTTGGGTGCGCTCCCGGGTGAAGTTTTCTCGCTCTGCCGATGCCCC
 25 AGCCTATCAGCAGGGCCAGAATCAGCTGTACAATGAACTGAACCTGGGCAGGCGGG
 AGGAGTACGACGTGCTGGATAAGCGGAGAGGCAGAGACCCCGAGATGGGCGGCAA
 ACCACGGCGCAAAAATCCCCAGGAGGGACTCTATAACGAGCTGCAGAAGGACAAA
 ATGGCCGAGGCCTATTCCGAGATCGGCATGAAGGGAGAGAGAAGACGCGGAAGG
 GCCACGACGGCCTGTATCAGGGATTGTCCACCGCTACAAAAGATACATATGATGCC
 30 CTGCACATGCAGGCCCTGCCACCCAGATGA

SEQ ID № 36

>MP14802.SFG.aCD19fmc63_clean-CD8STK-CD28tmZ-2A-aCD33glx-HCH2CH3pvaa-dCD45

ATGAGCCTGCCCCGTGACCGCCCTGCTGCTGCCCCCTGGCCCTGCTGCTGCACGCCG
 35 CCAGACCAGACATCCAGATGACCCAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGC
 GACCGGGTGACCATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTG
 GTACCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCCGGC
 TGCACAGCGGCGTGCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTACAGC
 CTGACCATCAGCAACCTGGAGCAGGAGGACATCGCCACCTACTTCTGCCAGCAGGG
 40 CAACACCCTGCCCTACACCTTCGGAGGCGGCACCAAGCTGGAGATACCAAGGCCG
 GAGGCGGAGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGG
 CAGCGAGGTGAAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGCCTGGTGGCCCCAAGCCAGAGCC
 TGAGCGTGACCTGCACCGTGAGCGGCGTGAGCCTGCCCGACTACGGCGTGAGCTGG
 ATCAGGCAGCCCCCACGGAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGA
 45 GACCACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACA
 GCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATC
 TACTACTGCGCCAAGCACTACTACTATGGCGGCAGCTACGCTATGGACTACTGGGG
 CCAGGGCACCCAGCGTGACCGTGAGCTCAGATCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGAC

CACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCG
TGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGA
TATCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGT
AACAGTGGCCTTTATTATTTCTGGGTGAGGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAG
5 ACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGA
CGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGG
GGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAA
AGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGG
GGCAAGGGGACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTA
10 CGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCTCCTCGCAGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTC
TTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCCCGGGGCCCATGGCCGTGCCCACTCAG
GTCCTGGGGTTGTTGCTACTGTGGCTTACAGATGCCAGATGTGACATCCAGATGACA
CAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGTGCGGAGATCGCGTCACCATCACCTGTCTGA
GCAAGTGAGGACATTTATTTTAATTTAGTGTGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGGC
15 CCCTAAGCTCCTGATCTATGATACAAATCGCTTGGCAGATGGGGTCCCATCACGGTT
CAGTGGCTCTGGATCTGGCACACAGTATACTCTAACCATAAGTAGCCTGCAACCCG
AAGATTTTCGCAACCTATTATTGTCAACACTATAAGAATTATCCGCTCACGTTCCGTC
AGGGGACCAAGCTGGAAATCAAAAGATCTGGTGGCGGAGGGTCAGGAGGCGGAGG
CAGCGGAGGCGGTGGCTCGGGAGGCGGAGGCTCGAGATCTGAGGTGCAGTTGGTG
20 GAGTCTGGGGGCGGCTTGGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGGCTCTCCTGTGCAGC
CTCAGGATTCACTCTCAGTAATTATGGCATGCACTGGATCAGGCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTGGAGTGGGTCTCGTCTATTAGTCTTAATGGTGGTAGCACTTACTATCGAG
ACTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGGGACAATGCAAAAAGCACCCCTCTAC
CTTCAAATGAATAGTCTGAGGGCCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCAGCACA
25 GGACGCTTATACGGGAGGTTACTTTGATTACTGGGGCCAAGGAACGCTGGTCACAG
TCTCGTCTATGGATCCCGCCGAGCCCAATCTCCTGACAAAACCTACACATGCCAC
CGTGCCCAGCACCTCCCGTGGCCGGCCCGTCAGTCTTCTCTTCCCCC AAAACCCA
AGGACACCCCTCATGATCGCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG
AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA
30 TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAG
GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACC
AAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
35 CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAACCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCC
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC
AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCCCTGCACAA
TCACTATACCCAGAAATCTCTGAGTCTGAGCCCAGGCAAGAAGGACCCCAAGGCAC
TGATAGCATTTCTGGCATTCTGATTATTGTGACATCAATAGCCCTGCTTGTTGTTCT
40 CTACAAAATCTATGATCTACATAAGAAAAGATCCTGCAATTTAGATGAACAGCAGG
AGCTTGTTGAAAGGGATGATGAAAAACAACCTGATGAATGTGGAGCCAATCCATGCA
GATATTTTGTGGAACCTTATAAGAGGAAGATTGCTGATGAAGGAAGACTTTTTCTG
GCTGAATTTAGAGCATCCCGCGGGTGTTCAGCAAGTTTCTATAAAGGAAGCTCG
AAAGCCCTTTAACCAGAATAAAAACCGTTATGTTGACATTCTTCTTATGATTATAA
45 CCGTGTGAACTCTCTGAGATAAACGGAGATGCAGGGTCAAACCTACATAAATGCCA
GCTATATTGATGGTTTCAAAGAACCAGGAAATACATTGCTGCACAAGGTCCCAGG
GATGAAACTGTTGATGATTTCTGGAGGATGATTTGGGAACAGAAAGCCACAGTTAT
TGTCATGGTCACTCGATGTGAAGAAGGAAACAGGAACAAGTGTGCAGAATACTGGC

CGTCAATGGAAGAGGGCACTCGGGCTTTTGGAGATGTTGTTGTAAAGATCAACCAG
 CACAAAAGATGTCCAGATTACATCATTGAGAAATTGAACATTGTAAATAAAAAAGA
 AAAAGCAACTGGAAGAGAGGTGACTCACATTCAGTTCACCAGCTGGCCAGACCACG
 GGGTGCCTGAGGATCCTCACTTGCTCCTCAAAGTGAAGAGAGTGAATGCCTTC
 5 AGCAATTTCTTCAGTGGTCCCATTGTGGTGCAGTGCAGTGTGGTGTGGGCGCACA
 GGAACCTATATCGGAATTGATGCCATGCTAGAAGGCCTGGAAGCCGAGAACAAAGT
 GGATGTTTATGGTTATGTTGTCAAGCTAAGGCGACAGAGATGCCTGATGGTTCAAGT
 AGAGGCCCAGTACATCTTGATCCATCAGGCTTTGGTGGAATACAATCAGTTTGGAG
 AAACAGAAGTGAATTTGTCTGAATTACATCCATATCTACATAACATGAAGAAAAGG
 10 GATCCACCCAGTGAGCCGTCTCCACTAGAGGCTGAATTCCAGAGACTTCCTTCATAT
 AGGAGCTGGAGGACACAGCACATTGGAAATCAAGAAGAAAATAAAAAGTAAAAACA
 GGAATTCTAATGTCATCCCATATGACTATAACAGAGTGCCACTTAAACATGAGCTGG
 AAATGAGTAAAGAGAGTGAGCATGATTCAGATGAATCCTCTGATGATGACAGTGAT
 TCAGAGGAACCAAGCAAATACATCAATGCATCTTTTATAATGAGCTACTGGAAACC
 15 TGAAGTGATGATTGCTGCTCAGGGACCACTGAAGGAGACCATTGGTGACTTTTGGC
 AGATGATCTTCCAAAGAAAAGTCAAAGTTATTGTTATGCTGACAGAAGTGAACAT
 GGAGACCAGGAAATCTGTGCTCAGTACTGGGGAGAAGGAAAGCAAACATATGGAG
 ATATTGAAGTTGACCTGAAAGACACAGACAAATCTTCAACTTATACCCTTCGTGTCT
 TTGAAGTGAAGACATTCCAAGAGGAAAGACTCTCGAACTGTGTACCAGTACCAATAT
 20 ACAAAGTGGAGTGTGGAGCAGCTTCCTGCAGAACCCAAGGAATTAATCTCTATGAT
 TCAGGTCTGTCAAACAAAACTTCCCCAGAGAATTCTCTGAAGGGAACAAGCATC
 ACAAGAGTACACCTCTACTCATTCACTGCAGGGATGGATCTCAGCAAACGGGAATA
 TTTTGTGCTTTGTTAAATCTCTTAGAAAGTGCGGAAACAGAAGAGGTAGTGGATATT
 TTTCAAGTGGTAAAAGCTCTACGCAAAGCTAGGCCAGGCATGGTTTCCACATTCTGA
 25 GCAATATCAATTCCTATATGACGTCATTGCCAGCACCTACCCTGCTCAGAATGGACA
 AGTAAAGAAAAACAACCATCAAGAAGATAAAATTGAATTTGATAATGAAGTGGAC
 AAAGTAAAGCAGGATGCTAATTGTGTTAATCCACTTGGTGCCCCAGAAAAGCTCCC
 TGAAGCAAAGGAACAGGCTGAAGGTTCTGAACCCACGAGTGGCACTGAGGGGCCA
 GAACATTCTGTCAATGGTCCTGCAAGTCCAGCTTTAAATCAAGGTTTCATAG

30 SEQ ID № 37:

>MP14801.SFG.aCD19fmc63_clean-CD8STK-CD28tmZ-2A-aCD33glx-HCH2CH3pvaa-
 dCD148

ATGAGCCTGCCCCGTGACCGCCCTGCTGCTGCCCCCTGGCCCTGCTGCTGCACGCCG
 CCAGACCAGACATCCAGATGACCCAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGC
 35 GACCGGGTGACCATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTG
 GTACCAGCAGAAGCCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCCGGC
 TGCACAGCGGCGTGCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTACAGC
 CTGACCATCAGCAACCTGGAGCAGGAGGACATCGCCACCTACTTCTGCCAGCAGGG
 CAACACCCTGCCCTACACCTTCGGAGGCGGCACCAAGCTGGAGATACCAAGGCCG
 40 GAGGCGGAGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGG
 CAGCGAGGTGAAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGCCTGGTGGCCCCAAGCCAGAGCC
 TGAGCGTGACCTGCACCGTGAGCGGCGTGAGCCTGCCCCGACTACGGCGTGAGCTGG
 ATCAGGCAGCCCCACGGAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGA
 GACCACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACA
 45 GCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATC
 TACTACTGCGCCAAGCACTACTACTATGGCGGCAGCTACGCTATGGACTACTGGGG
 CCAGGGCACCAGCGTGACCGTGAGCTCAGATCCACACGACGCCAGCGCCGCGAC
 CACCAACACCGGCGCCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCG

TGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGA
 TATCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGT
 AACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAG
 ACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGA
 5 CGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGG
 GGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAA
 AGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGG
 GGCAAGGGGACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTA
 CGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCTCCTCGCAGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTC
 10 TTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCCCGGGCCCATGGCCGTGCCCACTCAG
 GTCCTGGGGTTGTTGCTACTGTGGCTTACAGATGCCAGATGTGACATCCAGATGACA
 CAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGTCTGGAGATCGCGTCACCATCACCTGTCTGA
 GCAAGTGAGGACATTTATTTTAATTTAGTGTGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGGC
 CCCTAAGCTCCTGATCTATGATACAAATCGCTTGGCAGATGGGGTCCCATCACGGTT
 15 CAGTGGCTCTGGATCTGGCACACAGTATACTCTAACCATAAGTAGCCTGCAACCCG
 AAGATTTTCGCAACCTATTATTGTCAACACTATAAGAATTATCCGCTCACGTTCCGGTC
 AGGGGACCAAGCTGGAAATCAAAAGATCTGGTGGCGGAGGGTCAGGAGGCGGAGG
 CAGCGGAGGCGGTGGCTCGGGAGGCGGAGGCTCGAGATCTGAGGTGCAGTTGGTG
 GAGTCTGGGGGCGGCTTGGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGGCTCTCCTGTGCAGC
 20 CTCAGGATTCACCTCTCAGTAATTATGGCATGCACTGGATCAGGCAGGCTCCAGGGA
 AGGGTCTGGAGTGGGTCTCGTCTATTAGTCTTAATGGTGGTAGCACTTACTATCGAG
 ACTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGGGACAATGCAAAAAGCACCCCTCTAC
 CTTCAAATGAATAGTCTGAGGGCCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCAGCACA
 GGACGCTTATACGGGAGGTTACTTTGATTACTGGGGCCAAGGAACGCTGGTCAAG
 25 TCTCGTCTATGGATCCCGCCGAGCCCAAATCTCCTGACAAAACCTCACACATGCCAC
 CGTGCCCAGCACCTCCCGTGGCCGGCCCGTCAGTCTTCCCTCTCCCCCCCCAAAACCCA
 AGGACACCCTCATGATCGCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG
 AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA
 TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
 30 AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
 GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAG
 GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACC
 AAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
 CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAACCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCC
 35 GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC
 AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCCCTGCACAA
 TCACTATAACCAGAAATCTCTGAGTCTGAGCCCAGGCAAGAAGGACCCCAAGGCGG
 TTTTGGCTGTATCTTTGGTGGCCTGGTTATTGTGACTGTGGGAGGCTTCATCTTCTG
 GAGAAAGAAGAGGAAAGATGCAAAGAATAATGAAGTGTCTTTTCTCAAATTAAC
 40 CTAAAAAATCTAAGTTAATCAGAGTGGAGAATTTTGAGGCCTACTTCAAGAAGCAG
 CAAGCTGACTCCAAGTGTGGGTTTCGCAGAGGAATACGAAGATCTGAAGCTTGTGG
 AATTAGTCAACCTAAATATGCAGCAGAACTGGCTGAGAATAGAGGAAAGAATCGCT
 ATAATAATGTTCTGCCCTATGATATTTCCCGTGTCAAACCTTTCGGTCCAGACCCATTC
 AACGGATGACTACATCAATGCCAACTACATGCCTGGCTACCACTCCAAGAAAGATT
 45 TTATTGCCACACAAGGACCTTTACCGAACACTTTGAAAGATTTTGGCGTATGGTTT
 GGGAGAAAAATGTATATGCCATCATTATGTTGACTAAATGTGTTGAACAGGGAAGA
 ACCAAATGTGAGGAGTATTGGCCCTCCAAGCAGGCTCAGGACTATGGAGACATAAC
 TGTGGCAATGACATCAGAAATTGTTCTTCCGGAATGGACCATCAGAGATTTACAGT

GAAAAATATCCAGACAAGTGAGAGTCACCCTCTGAGACAGTTCCATTTACCTCCTG
 GCCAGACCACGGTGTTCCTCCGACACCACTGACCTGCTCATCAACTTCCGGTACCTCGT
 TCGTGACTACATGAAGCAGAGTCCTCCCGAATCGCCGATTCTGGTGCATTGCAGTGC
 TGGGGTCGGAAGGACGGGCACCTTTCATTGCCATTGATCGTCTCATCTACCAGATAGA
 5 GAATGAGAACACCGTGGATGTGTATGGGATTGTGTATGACCTTCGAATGCATAGGC
 CTTTAATGGTGCAGACAGAGGACCAGTATGTTTTCTCAATCAGTGTGTTTTGGATA
 TTGTCAGATCCCAGAAAGACTCAAAAGTAGATCTTATCTACCAGAACACAACCTGCA
 ATGACAATCTATGAAAACCTTGCGCCCGTGACCACATTTGGAAAGACCAATGGTTA
 CATCGCCTAA

10 SEQ ID № 38

>16076.SFG.aCD19fmc63-CD8STK-CD28tmZ-2A-aCD33glx-muCD8STK-tm-dPTPN6

ATGAGCCTGCCCCGTGACCGCCCTGCTGCTGCCCCCTGGCCCTGCTGCTGCACGCCG
 CCAGACCAGACATCCAGATGACCCAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGC
 GACCGGGTGACCATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTG
 15 GTACCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCCGGC
 TGCACAGCGGCGTGCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTACAGC
 CTGACCATCAGCAACCTGGAGCAGGAGGACATCGCCACCTACTTCTGCCAGCAGGG
 CAACACCCTGCCCTACACCTTCGGAGGCGGCACCAAGCTGGAGATCACCAAGGCCG
 GAGGCGGAGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGG
 20 CAGCGAGGTGAAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGCCTGGTGGCCCCAAGCCAGAGCC
 TGAGCGTGACCTGCACCGTGAGCGGCGTGAGCCTGCCCGACTACGGCGTGAGCTGG
 ATCAGGCAGCCCCCACGGAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGA
 GACCACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACA
 GCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATC
 25 TACTACTGCGCCAAGCACTACTACTATGGCGGCAGCTACGCTATGGACTACTGGGG
 CCAGGGCACCAGCGTGACCGTGAGCTCAGATCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGAC
 CACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCG
 TGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGA
 TATCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGT
 30 AACAGTGGCCTTTATTATTTCTGGGTGAGGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAG
 ACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGA
 CGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGG
 GGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAA
 AGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGG
 35 GGCAAGGGGACAGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTA
 CGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCTCCTCGCAGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTC
 TTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCCCGGGGCCATGGCCGTGCCCACTCAG
 GTCCTGGGGTTGTTGCTACTGTGGCTTACAGATGCCAGATGTGACATCCAGATGACA
 CAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGTGCGGAGATCGCGTCACCATCACCTGTCTGA
 40 GCAAGTGAGGACATTTATTTTAATTTAGTGTGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGGC
 CCCTAAGCTCCTGATCTATGATACAAATCGCTTGGCAGATGGGGTCCCATCACGGTT
 CAGTGGCTCTGGATCTGGCACACAGTATACTCTAACCATAAGTAGCCTGCAACCCG
 AAGATTTCGCAACCTATTATTGTCAACACTATAAGAATTATCCGCTCACGTTCCGGTC
 AGGGGACCAAGCTGGAAATCAAAAGATCTGGTGGCGGAGGGTCAGGAGGCGGAGG
 45 CAGCGGAGGCGGTGGCTCGGGAGGCGGAGGCTCGAGATCTGAGGTGCAGTTGGTG
 GAGTCTGGGGGCGGCTTGGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGGCTCTCCTGTGCAGC
 CTCAGGATTCACTCTCAGTAATTATGGCATGCACTGGATCAGGCAGGCTCCAGGGA
 AGGGTCTGGAGTGGGTCTCGTCTATTAGTCTTAATGGTGGTAGCACTTACTATCGAG

ACTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGGGACAATGCAAAAAGCACCCCTCTAC
 CTTCAAATGAATAGTCTGAGGGCCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCAGCACA
 GGACGCTTATACGGGAGGTTACTTTGATTACTGGGGCCAAGGAACGCTGGTCACAG
 TCTCGTCTATGGATCCCGCCACCACAACCAAGCCCGTGCTGCGGACCCCAAGCCCTG
 5 TGCACCCTACCGGCACCAGCCAGCCTCAGAGACCCGAGGACTGCCGGCCTCGGGGC
 AGCGTGAAGGGCACCGGCCTGGACTTCGCCTGCGACATCTACTGGGCACCTCTGGC
 CGGAATATGCGTGGCACTGCTGCTGAGCCTCATCATCACCTGATCTGTTATCACCG
 AAGCCGCAAGCGGGTGTGTAAAAGTGGAGGCGGAAGCTTCTGGGAGGAGTTTGAG
 AGTTTGCAGAAGCAGGAGGTGAAGAACTTGCACCAGCGTCTGGAAGGGCAGCGGC
 10 CAGAGAACAAAGGGCAAGAACCGCTACAAGAACATTCTCCCCTTTGACCACAGCCGA
 GTGATCCTGCAGGGACGGGACAGTAACATCCCCGGGTCCGACTACATCAATGCCAA
 CTACATCAAGAACCAGCTGCTAGGCCCTGATGAGAACGCTAAGACCTACATCGCCA
 GCCAGGGCTGTCTGGAGGCCACGGTCAATGACTTCTGGCAGATGGCGTGGCAGGAG
 AACAGCCGTGTCATCGTCATGACCACCCGAGAGGTGGAGAAAGGCCGGAACAAAT
 15 GCGTCCCATACTGGCCCCGAGGTGGGCATGCAGCGTGCTTATGGGCCCTACTCTGTGA
 CCAACTGCGGGGAGCATGACACAACCGAATACAAACTCCGTACCTTACAGGTCTCC
 CCGCTGGACAATGGAGACCTGATTCGGGAGATCTGGCATTACCAGTACCTGAGCTG
 GCCCCACCACGGGGTCCCCAGTGAGCCTGGGGGTGTCCTCAGCTTCCTGGACCAGA
 TCAACCAGCGGCAGGAAAGTCTGCCTCACGCAGGGCCCATCATCGTGCATGTCAGC
 20 GCCGGCATCGGCCGCACAGGCACCATCATTGTCATCGACATGCTCATGGAGAACAT
 CTCCACCAAGGGCCTGGACTGTGACATTGACATCCAGAAGACCATCCAGATGGTGC
 GGGCGCAGCGCTCGGGCATGGTGCAGACGGAGGCGCAGTACAAGTTCATCTACGTG
 GCCATCGCCCAGTTCATTGAAACCACTAAGAAGAAGCTGTGA

SEQ ID № 39

25 >MP16091.SFG.aCD19fmc63-CD8STK-CD28tmZ-2A-aCD33glx-muCD8STK-LAIR1tm-
 endo
 ATGAGCCTGCCCCGTGACCGCCCTGCTGCTGCCCCCTGGCCCTGCTGCTGCACGCCG
 CCAGACCAGACATCCAGATGACCCAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGC
 GACCGGGTGACCATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTG
 30 GTACCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCCGGC
 TGCACAGCGGCGTGCCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTACAGC
 CTGACCATCAGCAACCTGGAGCAGGAGGACATCGCCACCTACTTCTGCCAGCAGGG
 CAACACCCTGCCCTACACCTTCGGAGGCGGCACCAAGCTGGAGATCACCAAGGCCG
 GAGGCGGAGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGG
 35 CAGCGAGGTGAAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGCCTGGTGGCCCCAAGCCAGAGCC
 TGAGCGTGACCTGCACCGTGAGCGGCGTGAGCCTGCCCCGACTACGGCGTGAGCTGG
 ATCAGGCAGCCCCACGGAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGA
 GACCACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACA
 GCAAGAGCCAGGTGTTCCCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATC
 40 TACTACTGCGCCAAGCACTACTACTATGGCGGCAGCTACGCTATGGACTACTGGGG
 CCAGGGCACCAGCGTGACCGTGAGCTCAGATCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGAC
 CACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCG
 TGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGA
 TATCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGT
 45 AACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAG
 ACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGA
 CGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGG
 GGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAA

AGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGG
 GGCAAGGGGACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTA
 CGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCTCCTCGCAGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTC
 TTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCCCGGGCCCATGGCCGTGCCCACTCAG
 5 GTCCTGGGGTTGTTGCTACTGTGGCTTACAGATGCCAGATGTGACATCCAGATGACA
 CAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGTGCGAGATCGCGTCACCATCACCTGTCTGA
 GCAAGTGAGGACATTTATTTTAATTTAGTGTGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGGC
 CCCTAAGCTCCTGATCTATGATACAAATCGCTTGGCAGATGGGGTCCCATCACGGTT
 CAGTGGCTCTGGATCTGGCACACAGTATACTCTAACCATAAGTAGCCTGCAACCCG
 10 AAGATTTCGCAACCTATTATTGTCAACACTATAAGAATTATCCGCTCACGTTCCGGTC
 AGGGGACCAAGCTGGAAATCAAAGATCTGGTGGCGGAGGGTCAGGAGGCGGAGG
 CAGCGGAGGCGGTGGCTCGGGAGGCGGAGGCTCGAGATCTGAGGTGCAGTTGGTG
 GAGTCTGGGGGCGGCTTGGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGGCTCTCCTGTGCAGC
 CTCAGGATTCACCTCTCAGTAATTATGGCATGCACTGGATCAGGCAGGCTCCAGGGA
 15 AGGGTCTGGAGTGGGTCTCGTCTATTAGTCTTAATGGTGGTAGCACTTACTATCGAG
 ACTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGGGACAATGCAAAAAGCACCCCTCTAC
 CTTCAAATGAATAGTCTGAGGGCCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCAGCACA
 GGACGCTTATACGGGAGGTTACTTTGATTACTGGGGCCAAGGAACGCTGGTCACAG
 TCTCGTCTATGGATCCCGCCACCACAACCAAGCCCGTGCTGCGGACCCCAAGCCCTG
 20 TGCACCCTACCGGCACCAGCCAGCCTCAGAGACCCGAGGACTGCCGGCCTCGGGGC
 AGCGTGAAGGGCACCGGCCTGGACTTCGCCTGCGACATTCTCATCGGGGTCTCAGT
 GGTCTTCCTCTTCTGTCTCCTCCTCCTGGTCTCTTCTGCCTCCATCGCCAGAATCAG
 ATAAAGCAGGGGGCCCCCAGAAGCAAGGACGAGGAGCAGAAGCCACAGCAGAGGC
 CTGACCTGGCTGTTGATGTTCTAGAGAGGACAGCAGACAAGGCCACAGTCAATGGA
 25 CTTCTGAGAAGGACCGGGAGACCGACACCAGCGCCCTGGCTGCAGGGAGTTCCCA
 GGAGGTGACGTATGCTCAGCTGGACCACTGGGCCCTCACACAGAGGACAGCCCGGG
 CTGTGTCCCCACAGTCCACAAAGCCCATGGCCGAGTCCATCACGTATGCAGCCGTTG
 CCAGACACTGA

SEQ ID № 40

30 >MP16092.SFG.aCD19fmc63-CD8STK-CD28tmZ-2A-aCD33glx-muCD8STK-LAIR1tm-
 endo-2A-PTPN6_SH2-dCD148
 ATGAGCCTGCCCCGTGACCGCCCTGCTGCTGCCCCCTGGCCCTGCTGCTGCACGCCG
 CCAGACCAGACATCCAGATGACCCAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGC
 GACCGGGTGACCATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTG
 35 GTACCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCCGGC
 TGCACAGCGGCGTGCCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTACAGC
 CTGACCATCAGCAACCTGGAGCAGGAGGACATCGCCACCTACTTCTGCCAGCAGGG
 CAACACCCTGCCCTACACCTTCGGAGGCGGCACCAAGCTGGAGATCACCAAGGCCG
 GAGGCGGAGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGG
 40 CAGCGAGGTGAAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGCCTGGTGGCCCCAAGCCAGAGCC
 TGAGCGTGACCTGCACCGTGAGCGGCGTGAGCCTGCCCCGACTACGGCGTGAGCTGG
 ATCAGGCAGCCCCACGGAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGA
 GACCACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACA
 GCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATC
 45 TACTACTGCGCCAAGCACTACTACTATGGCGGCAGCTACGCTATGGACTACTGGGG
 CCAGGGCACCAGCGTGACCGTGAGCTCAGATCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGAC
 CACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCG
 TGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGA

TATCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGT
 AACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAG
 ACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGA
 CGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGG
 5 GGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAA
 AGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGG
 GGCAAGGGGACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTA
 CGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCTCCTCGCAGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTC
 TTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCCCGGGCCCATGGCCGTGCCCACTCAG
 10 GTCCTGGGGTTGTTGCTACTGTGGCTTACAGATGCCAGATGTGACATCCAGATGACA
 CAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGTGCGGAGATCGCGTCACCATCACCTGTCTGA
 GCAAGTGAGGACATTTATTTTAATTTAGTGTGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGGC
 CCCTAAGCTCCTGATCTATGATACAAATCGCTTGGCAGATGGGGTCCCATCACGGTT
 CAGTGGCTCTGGATCTGGCACACAGTATACTCTAACCATAAGTAGCCTGCAACCCG
 15 AAGATTTTCGCAACCTATTATTGTCAACACTATAAGAATTATCCGCTCACGTTCCGGTC
 AGGGGACCAAGCTGGAAATCAAAAGATCTGGTGGCGGAGGGTCAGGAGGCGGAGG
 CAGCGGAGGCGGTGGCTCGGGAGGCGGAGGCTCGAGATCTGAGGTGCAGTTGGTG
 GAGTCTGGGGGCGGCTTGGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGGCTCTCCTGTGCAGC
 CTCAGGATTCACTCTCAGTAATTATGGCATGCACTGGATCAGGCAGGCTCCAGGGA
 20 AGGGTCTGGAGTGGGTCTCGTCTATTAGTCTTAATGGTGGTAGCACTTACTATCGAG
 ACTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGGGACAATGCAAAAAGCACCCCTCTAC
 CTTCAAATGAATAGTCTGAGGGCCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCAGCACA
 GGACGCTTATACGGGAGGTTACTTTGATTACTGGGGCCAAGGAACGCTGGTCACAG
 TCTCGTCTATGGATCCCGCCACCACAACCAAGCCCGTGCTGCGGACCCCAAGCCCTG
 25 TGCACCCTACCGGCACCAGCCAGCCTCAGAGACCCGAGGACTGCCGGCCTCGGGGC
 AGCGTGAAGGGCACCGGCCTGGACTTCGCCTGCGACATTCTCATCGGGGTCTCAGT
 GGTCTTCCTCTTCTGTCTCCTCCTCCTGGTCCTCTTCTGCCTCCATCGCCAGAATCAG
 ATAAAGCAGGGGGCCCCCAGAAGCAAGGACGAGGAGCAGAAGCCACAGCAGAGGC
 CTGACCTGGCTGTTGATGTTCTAGAGAGGACAGCAGACAAGGCCACAGTCAATGGA
 30 CTTCTGAGAAGGACCGGGAGACCGACACCAGCGCCCTGGCTGCAGGGAGTTCCCA
 GGAGGTGACGTATGCTCAGCTGGACCACTGGGCCCTCACACAGAGGACAGCCCGGG
 CTGTGTCCCCACAGTCCACAAAGCCCATGGCCGAGTCCATCACGTATGCAGCCGTTG
 CCAGACACAGGGCAGAAGGAAGAGGTAGCCTGCTGACTTGCGGGGACGTGGAAGA
 GAACCCAGGGCCATGGTATCATGGCCACATGTCTGGCGGGCAGGCAGAGACGCTGC
 35 TGCAGGCCAAGGGCGAGCCCTGGACGTTTCTTGTGCGTGAGAGCCTCAGCCAGCCT
 GGAGACTTCGTGCTTTCTGTGCTCAGTGACCAGCCCAAGGCTGGCCCAGGCTCCCCG
 CTCAGGGTCACCCACATCAAGGTCATGTGCGAGGGTGGACGCTACACAGTGGGTGG
 TTTGGAGACCTTCGACAGCCTCACGGACCTGGTGGAGCATTTCAGAAGACGGGGA
 TTGAGGAGGCCTCAGGCGCCTTTGTCTACCTGCGGCAGCCGTACAGCGGTGGCGGT
 40 GGCAGCTTTGAGGCCTACTTCAAGAAGCAGCAAGCTGACTCCAAGTGTGGGTTTCGC
 AGAGGAATACGAAGATCTGAAGCTTGTGGAATTAGTCAACCTAAATATGCAGCAG
 AACTGGCTGAGAATAGAGGAAAGAATCGCTATAATAATGTTCTGCCCTATGATATT
 TCCCGTGTCAAACCTTTCGGTCCAGACCCATTCAACGGATGACTACATCAATGCCAAC
 TACATGCCTGGCTACCACTCCAAGAAAGATTTTATTGCCACACAAGGACCTTTACCG
 45 AACACTTTGAAAGATTTTTGGCGTATGGTTTGGGAGAAAAATGTATATGCCATCATT
 ATGTTGACTAAATGTGTTGAACAGGGAAGAACCAAATGTGAGGAGTATTGGCCCTC
 CAAGCAGGCTCAGGACTATGGAGACATAACTGTGGCAATGACATCAGAAATTGTTT
 TTCCGGAATGGACCATCAGAGATTTACAGTGAAAAATATCCAGACAAGTGAGAGT

CACCCTCTGAGACAGTTCCATTTACCTCCTGGCCAGACCACGGTGTTCCTGACACC
 ACTGACCTGCTCATCAACTTCCGGTACCTCGTTCGTGACTACATGAAGCAGAGTCCT
 CCCGAATCGCCGATTCTGGTGCATTGCAGTGCTGGGGTCGGAAGGACGGGCACTTT
 CATTGCCATTGATCGTCTCATCTACCAGATAGAGAATGAGAACACCGTGGATGTGTA
 5 TGGGATTGTGTATGACCTTCGAATGCATAGGCCTTTAATGGTGCAGACAGAGGACC
 AGTATGTTTTTCCSTCAATCAGTGTGTTTTGGATATTGTCAGATCCCAGAAAGACTCAA
 AAGTAGATCTTATCTACCAGAACACAACCTGCAATGACAATCTATGAAAACCTTGCG
 CCCGTGACCACATTTGGAAAGACCAATGGTTACATCGCCAGCGGTAGCTAA

Последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать ту же аминокислотную
 10 последовательность, как та, которую кодирует SEQ ID № 35, 36, 37, 38, 39 или 40, но
 может иметь отличающуюся последовательность нуклеиновой кислоты из-за
 вырожденности генетического кода. Последовательность нуклеиновой кислоты может
 иметь по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентичности с последовательностью,
 представленной в качестве SEQ ID № 35, 36, 37, 38, 39 или 40, при условии, что она
 15 кодирует первый CAR и второй CAR, как определено в первом аспекте изобретения.

ВЕКТОР

Настоящее изобретение также относится к вектору или набору векторов, которые
 содержат одну или несколько CAR-кодирующих последовательностей нуклеиновых
 кислот. Такой вектор можно использовать для того, чтобы вводить последовательность
 20 (последовательности) нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина с тем, чтобы она
 экспрессировала первый и второй CAR.

Вектор может представлять собой, например, плазмидный или вирусный вектор,
 такой как ретровирусный вектор или лентивирусный вектор, или вектор на основе
 транспозона или синтетическую мРНК.

25 Вектор может быть способен к трансфекции или трансдукции Т-клетки.

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, которая
 содержит множество CAR-экспрессирующих клеток, таких как Т-клетки или естественные
 киллерные клетки, в соответствии с первым аспектом изобретения. Фармацевтическая
 30 композиция дополнительно может содержать фармацевтически приемлемый носитель,
 разбавитель или эксципиент. Фармацевтическая композиция необязательно может
 содержать один или несколько дополнительных фармацевтически активных
 полипептидов и/или соединений. Такой состав, например, может быть в форме,
 подходящей для внутривенной инфузии.

СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ

Т-клетки по настоящему изобретению могут быть способны уничтожать клетки-
 мишени, такие как клетки злокачественной опухоли. Клетка-мишень может быть
 распознана с помощью определенного паттерна антигенной экспрессии, например,
 экспрессии антигена А И антигена В; экспрессии антигена А ИЛИ антигена В; или
 40 экспрессии антигена А И НЕ антигена В или комплексных итераций этих логических
 элементов.

Т-клетки по настоящему изобретению можно использовать для лечения инфекции,
 такой как вирусная инфекция.

Т-клетки по изобретению также можно использовать для управления патогенными
 45 иммунными ответами, например, при аутоиммунных заболеваниях, аллергиях и реакциях
 трансплантат против хозяина.

Т-клетки по изобретению можно использовать для лечения злокачественных
 заболеваний, таких как злокачественная опухоль мочевого пузыря, злокачественная

опухоль молочной железы, злокачественная опухоль ободочной кишки, злокачественная опухоль эндометрия, злокачественная опухоль почки (клеток почки), лейкоз, злокачественная опухоль легких, меланома, неходжкинская лимфома, злокачественная опухоль поджелудочной железы, злокачественная опухоль предстательной железы и

5 злокачественная опухоль щитовидной железы.

В частности, это подходит для лечения солидных опухолей, когда доступность хороших избирательных одинарных мишеней ограничена.

Т-клетки по изобретению можно использовать для того, чтобы лечить:

10 злокачественные опухоли полости рта и глотки, которые включают злокачественную опухоль языка, рта и глотки; злокачественные опухоли пищеварительной системы, которые включают злокачественные опухоли пищевода, желудка и толстой кишки; злокачественные опухоли печени и желчных протоков, которые включают

15 гепатоцеллюлярные карциномы и холангиокарциномы; злокачественные опухоли дыхательной системы, которые включают бронхогенные злокачественные опухоли и злокачественные опухоли гортани; злокачественные опухоли костей и суставов, которые включают остеосаркому; злокачественные опухоли кожи, которые включают меланому; злокачественную опухоль молочной железы; злокачественные опухоли полового тракта, которые включают злокачественные опухоли матки, яичников и шейки матки у женщин, злокачественные опухоли предстательной железы и яичек у мужчин; злокачественные

20 опухоли мочевыделительной системы, которые включают почечноклеточную карциному и переходно-клеточные карциномы уретры или мочевого пузыря; злокачественные опухоли головного мозга, включая глиомы, мультиформную глиобластому и медуллобластомы; злокачественные опухоли эндокринной системы, включая злокачественную опухоль щитовидной железы, карциному надпочечника, и

25 злокачественные опухоли, связанные с синдромами множественных эндокринных новообразований; лимфомы, включая лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому; множественную миелому и плазмцитомы; лейкозы, как острые, так и хронические, миелоидные или лимфоидные; и злокачественные опухоли других и неустановленных мест, включая нейробластому.

30 Лечение с использованием Т-клеток по изобретению может помогать предотвращать ускользание или освобождение опухолевых клеток, которые часто возникают при стандартных подходах.

Далее изобретение дополнительно описано в виде примеров, которые должны служить в качестве помощи специалисту в данной области при выполнении изобретения и не

35 предназначены каким-либо образом ограничивать объем изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1 - создание популяций клеток-мишеней

С целью подтверждения принципа изобретения произвольно выбирали рецепторы на основании средств против CD19 и против CD33. Используя ретровирусные векторы,

40 клонировали CD19 и CD33. Эти белки усекали с тем, чтобы они не передавали сигнал и могли быть стабильно экспрессированы в течение длительных периодов. Затем эти векторы использовали для трансдукции клеточной линии SupT1, или однократно или двукратно, чтобы создавать клетки, негативные по обоим антигенам (дикого типа), положительные по любому и положительные по обоим. Экспрессионные данные

45 представлены на фиг. 3.

Пример 2 - конструкция и функция логического элемента ИЛИ

Для того чтобы конструировать логический элемент ИЛИ, совместно экспрессировали пару рецепторов, распознающих CD19 и CD33. Различные спейсеры

использовали для того, чтобы предотвращать образование перекрестных пар. Оба рецептора имели трансмембранный домен, полученный из CD28, чтобы повышать поверхностную стабильность, и эндодомен, полученный из такового в CD3 дзета, чтобы предоставлять простой активирующий сигнал. Таким образом, совместно экспрессировали пару независимых CAR первого поколения. В ретровирусной векторной кассете, используемой для того, чтобы совместно экспрессировать последовательности, используют саморасщепляющийся пептид 2А вируса ящура, чтобы сделать возможным коэкспрессию обоих рецепторов 1:1. Конструкция кассеты показана на фиг. 4, а структуры белков на фиг. 5. В нуклеотидную последовательность гомологичных областей вносили неоднозначность кодонов для того, чтобы предотвращать рекомбинацию во время обратной транскрипции ретровирусного вектора.

Пример 3 - тестирование логического элемента ИЛИ

Экспрессию обоих CAR тестировали на поверхности Т-клеток посредством окрашивания когнатым антигеном, слитым с Fc. Используя Fc домены различных видов (мышинные для CD19 и кроличьи для CD33), коэкспрессию обоих CAR определяли на клеточной поверхности посредством окрашивания различными вторичными антителами, конъюгированными с различными флуорофорами. Это показано на фиг. 6.

Затем осуществляли функциональное тестирование с использованием линии Т-клеток мыши BW5147. Эта клеточная линия секретирует IL-2 при активации, что делает возможным простое количественное считывание. Эти Т-клетки совместно культивировали с возрастающими количествами искусственных клеток-мишеней, описанных выше. Т-клетки реагировали на клетки-мишени, экспрессирующие их антиген, как показано с помощью секреции IL-2, измеряемой посредством ELISA. Показана экспрессия обоих CAR на клеточных поверхностях и показано, что Т-клетки реагировали на любой или оба антигена. Эти данные представлены на фиг. 7.

Пример 4 - конструкция и функция логического элемента И

Логический элемент И объединяет простой активирующий рецептор с рецептором, который осуществляет базовое ингибирование активности, но у которого ингибирование выключается, когда рецептор лигирован. Этого достигали посредством объединения стандартного CAR первого поколения с коротким/некрупным спейсером из «стебля» CD8 и дзета-эндодоменом CD3 со вторым рецептором с крупным Fc спейсером, эндодомен которого содержал или эндодомен CD148 или эндодомен CD45. Когда оба рецептора лигированы, различия в размерах спейсеров ведут к выделению различных рецепторов в различные мембранные компартменты, устранению ингибирования CD3 дзета рецептора с помощью эндодоменов CD148 или CD45. Таким образом, активация происходит только когда активируют оба рецептора. Для этого выбрали CD148 и CD45, поскольку они функционируют так нативным образом: например, очень крупный CD45 эктодомен исключает весь рецептор из иммунологического синапса. Экспрессирующая кассета изображена на фиг. 8 и последующие белки на фиг. 9.

Окрашивание поверхности по другой специфичности демонстрировало, что обе пары рецепторов могут быть эффективно экспрессированы на клеточной поверхности, представленной на фиг. 10. Функционирование в BW5147 показывает, что активация Т-клеток происходит только в присутствии обоих антигенов (фиг. 11).

Пример 5: демонстрация генерализуемости логического элемента И

Чтобы гарантировать, что наблюдения не представляли собой манифестацию некоторой конкретной характеристики CD19/CD33 и использованных их связывающих средств, два направленных scFv меняли местами так, что после этого передача

активирующего (ITAM) сигнала происходила при распознавании CD33 вместо CD19; а передача ингибирующего (CD148) сигнала происходила при распознавании CD19 вместо CD33. Поскольку эндодомены CD45 и CD148 считают функционально схожими, эксперименты ограничивали логическими элементами И с эндодоменом CD148. Это
 5 все еще должно давать функциональный логический элемент И. Т-клетки, экспрессирующие новый логический элемент, стимулировали мишенями, несущими отдельно CD19 или CD33 или их оба. Т-клетки отвечали на мишени, экспрессирующие как CD19, так и CD33, но не на мишени, экспрессирующие только один или ни одного из этих антигенов. Это демонстрирует, что логический элемент И все еще функционален
 10 в этом формате (фиг. 18B).

На тех же линиях предполагали установить, насколько генерализуемым является логический элемент И: логический элемент И должен быть генерализуемым среди различных мишеней. Хотя может иметь место меньшая или большая точность логического элемента с учетом относительной антигенной плотности, кинетики
 15 когнатного связывания scFv и конкретного расстояния до связывающего эпитопа scFv, следует ожидать увидеть некоторые манифестации логического элемента И с широким набором мишеней и связывающих средств. Для того чтобы тестировать это, создавали три дополнительных логических элемента И. Еще раз, эксперименты ограничивали версией логического элемента И с CD148. Второй scFv из исходного логического
 20 элемента И с CD148 заменяли на scFv huK666 против GD2 (SEQ ID 41 и SEQ ID 42) или на scFv против CD5 (SEQ ID 43 и SEQ ID 44) или scFv MR1.1 против EGFRvIII (SEQ ID 45 и SEQ ID 46) для того, чтобы создавать следующие CAR логические элементы И: CD19 и GD2; CD19 и CD5; CD19 и EGFRvIII. Также создавали следующие искусственные экспрессирующие антиген клеточные линии: посредством трансдукции SupT1 и
 25 SupT1.CD19 по изобретению синтазами GM3 и GD2 создавали SupT1.GD2 и SupT1.CD19.GD2. Посредством трансдукции SupT1 и SupT1.CD19 ретровирусным вектором, кодирующим EGFRvIII, создавали SupT1.EGFRvIII и SupT1.CD19.EGFRvIII. Поскольку CD5 экспрессирован на клетках SupT1, использовали другую клеточную линию для того, чтобы создавать клетки-мишени: создавали 293Т клетки, которые
 30 экспрессируют только CD19, только CD5 и вместе CD5 и CD19. Экспрессию подтверждали с помощью проточной цитометрии (фиг. 19). Т-клетки, экспрессирующие три новых CAR логических элемента И, стимулировали с использованием SupT1.CD19 и соответствующих когнатных двойных положительных и одинарных положительных клеток-мишеней. Все три логических элемента И демонстрировали пониженную
 35 активацию двойными положительными клеточными линиями в сравнении с одинарными положительными мишенями (фиг. 20). Это демонстрирует генерализуемость конструкции логического элемента И на произвольные мишени и когнатные связывающие средства.

Пример 6: экспериментальное подтверждение модели кинетической сегрегации CAR логического элемента И

40 Цель заключалась в подтверждении моделированием того, что дифференциальная сегрегация, обусловленная различными спейсерами, представляет собой центральный механизм, лежащий в основе способности генерировать эти CAR логические элементы. Модель представляет собой то, что если лигирован только активирующий CAR, сильный ингибирующий «выключаемый лигированием» CAR находится в растворе в мембране
 45 и может ингибировать активирующий CAR. Когда лигированы оба CAR, если оба CAR спейсера достаточно различны, они будут сегрегироваться в синапсе и не локализоваться совместно. Таким образом, ключевое требование состоит в том, чтобы спейсеры были достаточно различными. Если модель верна, если оба спейсера достаточно схожи, что

они были совместно локализованы, когда оба рецептора лигированы, логический элемент не сможет функционировать. Для того чтобы тестировать это, «крупный» Fc спейсер в исходном CAR заменяли на мышинный CD8 спейсер. Предсказано, что он имеет схожую длину, объем и заряд с CD8 человека, но при этом не образует перекрестных пар с ним. Таким образом, новый логический элемент имел первый CAR, который распознает CD19, спейсер «стебля» CD8 человека и активирующий эндодомен; тогда как второй CAR распознает CD33, имеет спейсер «стебля» CD8 мыши и эндодомен CD148 (фиг. 18C). Т-клетки трансдуцировали для того, чтобы экспрессировать этот новый CAR логический элемент. Затем эти Т-клетки стимулировали клетками SupT1, экспрессирующими только CD19, только CD33 или оба CD19 и CD33 вместе. Т-клетки не отвечали на клетки SupT1, экспрессирующие любой антиген отдельно, как и исходный логический элемент И. Однако CAR Т-клетки не могли отвечать на клетки SupT1, экспрессирующие оба антигена, тем самым подтверждая модель (фиг. 18C). Для функционального логического элемента И необходимо, чтобы оба CAR имели спейсеры, достаточно различные, чтобы они не локализовались совместно в иммунологическом синапсе (фиг. 23А и В).

Пример 7 - Конструкция и функция логического элемента И НЕ

Фосфатазы, такие как CD45 и CD148, достаточно активны, чтобы даже малое количество, входящее в иммунологический синапс, могло ингибировать ITAM активацию. Это является основной ингибирования логического элемента И. Другие классы фосфатаз не настолько активны, например, RPTN6 и родственные фосфатазы. Предсказано, что небольшое количество RPTN6, попадающее в синапс посредством диффузии, не будет ингибировать активацию. Кроме того, предсказано, что если ингибирующий CAR имеет достаточно схожий спейсер с активирующим CAR, они могут локализоваться совместно в синапсе, если оба CAR лигированы. В этом случае большие количества ингибирующего эндодомена будут достаточны для того, чтобы останавливать ITAM активацию, когда оба антигена присутствуют. Таким образом, можно создавать логический элемент И НЕ.

Для логического элемента НЕ И второй сигнал должен запрещать активацию. Это выполняют посредством привнесения ингибирующего сигнала в иммунологический синапс, например, посредством привнесения фосфатазы фермента, такого как RPTN6. Таким образом, авторы изобретения создавали начальный логический элемент И НЕ следующим образом: совместно экспрессировали два CAR, где первый распознает CD19, имеет спейсер «стебля» CD8 человека и активирующий эндодомен; и CAR против CD33 со спейсером «стебля» CD8 мыши и эндодоменом, который содержит каталитический домен из RPTN6 (SEQ ID 38, фиг. 13А и В). На фиг. 12 представлена подходящая кассета, а на фиг. 14 представлены предварительные функциональные данные.

Кроме того, для создания логического элемента И НЕ разрабатывали альтернативную стратегию. Иммунорецепторные тирозиновые ингибирующие мотивы (ITIM) активировали подобно ITAM в том отношении, что они становятся фосфорилированными с помощью Ick при кластеризации и исключении фосфатаз. Взамен запуска активации посредством связывания ZAP70, фосфорилированные ITIM привлекают фосфатазы, такие как RPTN6, через их когнатные домены SH2. ITIM может выполнять функцию ингибирующего эндодомена до тех пор, пока спейсеры на активирующих и ингибирующих CAR могут локализоваться совместно. Для того чтобы создать эту конструкцию, логический элемент И НЕ создавали следующим образом: совместно экспрессировали два CAR - первый распознает CD19, имеет спейсер «стебля»

CD8 человека и активирующий эндодомен; и CAR против CD33 со спейсером «стебля» CD8 мыши и ITIM-содержащим эндодоменом, полученным из такового из LAIR1 (SEQ ID 39, фиг. 13A и C).

Также разрабатывали более сложный логический элемент И НЕ также, посредством чего ITIM усиливали с помощью присутствия дополнительного химерного белка: внутриклеточное слияние домена SH2 из RTPN6 и эндодомена из CD148. В этой конструкции экспрессируют три белка - первый распознает CD19, имеет спейсер «стебля» CD8 человека и активирующий эндодомен; совместно экспрессировали с CAR против CD33 со спейсером «стебля» CD8 мыши и ITIM-содержащим эндодоменом, полученным из такового из LAIR1. Дополнительный пептид 2A делает возможной коэкспрессию слитного белка RTPN6-CD148 (SEQ ID 40, фиг. 13A и D). Предсказано, что эти логические элементы И НЕ будут иметь различный диапазон ингибирования: RTPN6-CD148 > RTPN6 >> ITIM.

Т-клетки трансдуцировали с использованием этих логических элементов и стимулировали мишенями, экспрессирующими отдельно CD19 или CD33 или оба CD19 и CD33 вместе. Все три логических элемента отвечали на мишени, экспрессирующие только CD19, но не мишени, экспрессирующие оба CD19 и CD33 вместе (фиг. 21), что подтверждало, что все три логических элемента И НЕ были функциональны.

Пример 8: экспериментальное подтверждение модели кинетической сегрегации логического элемента И НЕ на основе RTPN6.

Модель логического элемента И НЕ основана на том факте, что свойства спейсеров, используемых в обоих CAR, являются ключевыми для правильного функционирования логического элемента. В функциональном логическом элементе И НЕ с использованием RTPN6, оба спейсера CAR достаточно схожи, чтобы, когда оба CAR лигированы, оба совместно локализовались в синапсе, так что высокая концентрация даже слабой RTPN6 является достаточной для того, чтобы ингибировать активацию. Если спейсеры различны, сегрегация в синапсе будет изолировать RTPN6 от ITAM, что делает возможной активацию, нарушающую логический элемент И НЕ. Для того чтобы тестировать это, создавали контроль, в котором заменяли мышинный спейсер из «стебля» CD8 на таковой из Fc. В этом случае, тестовый логический элемент состоял из двух CAR, первый распознает CD19, имеет спейсер «стебля» CD8 человека и ITAM эндодомен; тогда как второй CAR распознает CD33, имеет Fc спейсер и эндодомен, состоящий из фосфатазы из RTPN6. Этот логический элемент активирует в ответ на CD19, но также активирует в ответ на CD19 и CD33 вместе (фиг. 22B, где функционирование этого логического элемента сравнивают с таковой у исходного И НЕ и контрольного варианта логического элемента И, описанного в примере 6). Эти экспериментальные данные подтверждают модель, в которой для функционального логического элемента И НЕ с использованием RTPN6 необходимы совместно локализирующие спейсеры.

Пример 9: экспериментальное подтверждение модели кинетической сегрегации логического элемента И НЕ на основе ITIM.

Подобно логическому элементу И НЕ на основе RTPN6, для логического элемента на основе ITIM также необходима совместная локализация в иммунологическом синапсе, чтобы функционировать в качестве логического элемента И НЕ. Чтобы подтвердить эту гипотезу, создавали контрольный логический элемент на основе ITIM следующим образом: совместно экспрессировали два CAR - первый распознает CD19, имеет спейсер «стебля» CD8 человека и активирующий эндодомен; второй CAR против CD33 с Fc спейсером и ITIM-содержащим эндодоменом, полученным из такового из LAIR1. Активность этого логического элемента сравнивали с таковой у исходного логического

элемента И НЕ на основе ITIM. В этом случае активация модифицированного логического элемента происходила в ответ на мишени, экспрессирующие CD19, но также происходила в ответ на клетки, экспрессирующие оба CD19 и CD33. Эти данные показывают, что логические элементы И НЕ на основе ITIM придерживаются модели, основанной на кинетической сегрегации, и правильный спейсер следует выбирать для того, чтобы создавать функциональный логический элемент (фиг. 23B).

Пример 10: краткое описание модели логических элементов CAR, созданной посредством кинетической сегрегации

На основании текущего понимания модели кинетической сегрегации и экспериментальных данных, описанных в настоящем документе, краткое описание модели для логического элемента из двух CAR представлено на фиг. 24. На фиг. Показана клетка, которая экспрессирует два CAR, каждый распознает отличающийся антиген. Когда любой один или оба CAR распознают антиген-мишень на клетке, происходит формирование синапса и исключение нативных CD45 и CD148 из синапса из-за массивности их эктодомена. Это задает основу для активации Т-клеток. В том случае, когда клетка-мишень несет только один когнатных антиген, когнатный CAR лигирован и когнатный CAR сегрегируется в синапс. Нелигированный CAR остается в растворе на мембране Т-клетки и может диффундировать в синапс и из него с тем, чтобы происходило формирование области высокой локальной концентрации лигированного CAR с низкой концентрацией нелигированного CAR. В этом случае, если лигированный CAR имеет ITAM и нелигированный CAR имеет ингибирующий эндодомен «выключаемого лигированием», типа такой как таковой из CD148, количество нелигированного CAR является достаточным для того, чтобы ингибировать активацию и выключать логический элемент. В отличие от этого, в том случае, если лигированный CAR имеет ITAM и нелигированный CAR имеет ингибирующий эндодомен «включаемого лигированием» типа, такой как PTPN6, количество нелигированного CAR является недостаточным для того, чтобы осуществлять ингибирование, и логический элемент включен. Когда стимулируют клеткой-мишенью, несущей оба когнатных антигена, оба когнатных CAR лигированы и образуют часть иммунологического синапса. Важно, если CAR спейсеры достаточно схожи, CAR совместно локализованы в синапсе, но если CAR спейсере достаточно различны, CAR сегрегируются внутри синапса. В этом последнем случае, происходит формирование областей мембраны, в которых присутствуют высокие концентрации одного CAR, но другой CAR отсутствует. В этом случае, поскольку сегрегация выполнена, даже если ингибирующий эндодомен относится к «выключаемому лигированием» типу, логический элемент включен. В первом случае, происходит формирование областей мембраны с высокими концентрациями обоих CAR, смешанных вместе. В этом случае, поскольку оба эндодомена концентрированы, даже если ингибирующий эндодомен относится ко «включаемому лигированием» типу, логический элемент выключен. Посредством отбора в CAR Т-клетке можно программировать правильную логическую комбинацию спейсера и эндодомена.

На основании вышеописанной работы авторов изобретения, они установили ряд правил разработки для того, чтобы сделать возможным поколение CAR для логических элементов (проиллюстрировано на фиг. 31). Для того чтобы создавать Т-клетку с CAR логическим элементом «антиген А ИЛИ антиген В», следует создавать CAR против А и против В так, что (1) каждый CAR имеет спейсер, который делает возможным легкий доступ к антигену и формирование синапса так, что CAR функционирует, и (2) каждый CAR имеет активирующий эндодомен; для того чтобы генерировать Т-клетку с CAR логическим элементом «антиген А И НЕ В», CAR против А и против В следует создавать

так, что (1) оба CAR имеют спейсеры, которые не образуют перекрестных пар, но которые допускают совместную сегрегацию CAR при распознавании обоих когнатных антигенов на клетке-мишени, (2) и один CAR имеет активирующий эндодомен, тогда как другой CAR имеет эндодомен, который содержит или рекрутирует слабую фосфатазу (например, PTPN6); (3) для того чтобы генерировать Т-клетку с CAR логическим элементов «антиген А И антиген В», следует создавать CAR против А и против В так, что (1) один CAR имеет спейсер, достаточно отличающийся от другого CAR так, что оба CAR не будет совместно сегрегироваться при распознавании обоих когнатных антигенов на клетке-мишени, (2) один CAR имеет активирующий эндодомен, тогда как другой CAR имеет эндодомен, который состоит из сильной фосфатазы (например, таковой из CD45 или CD148). Правильные спейсеры для достижения желаемого эффекта можно выбирать из набора спейсеров с известными размером/геометрической формой и т.п., а также принимая во внимание размер/геометрическую форму и т.п. антигена-мишени (например, см. фиг. 30) и местоположение когнатного эпитопа на антигене-мишени.

SEQ ID № 41: SFG.aCD19-CD8STK-CD28tmZ-2A-aGD2-HCH2CH3pvaa-dCD148

MSLPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQ
QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTF
GGGKLEITKAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGV
SLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWIGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQ
TDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIFWVLVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRRVKFSRS
ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ
KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRRAEGRGSL
LTCGDVEENPGPMETDTLLLWVLLWVPGSTGQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGF
SLASYNHWWVRQPPGKGLEWLGVWAGGSTNYNSALMSRLTISKDNSKNQVFLKMSSL
TAADTAVYYCAKRSDDYSWFAYWGQGTSLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSENQMTQSP
SSLSASVGDRTMTCRASSSVSSYLHWYQQKSGKAPKVIWYSTSNLASGVPSRFSGSG
SGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYSGYPITFGQGTKVEIKRSDPAEPKSPDKTHTCPPCP
APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIAARTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKAVFGCIFGALVIV
TVGGFIFWRKKRKDAKNNEVSFSQIKPKKSKLIRVENFEAYFKKQQADSNCGFEEYED
LKLVGISQPKYAAELAENRGKNRYNNVLPYDISRVKLSVQTHSTDDYINANYMPGYHS
KKDFIATQGPLPNTLKDFWRMVWEKNVYAIIMLTKEVEQGRTEKCEEYWPSKQAQDYG
DITVAMTSEIVLPEWTIRDFTVKNQITSESHPLRQFHFTSWPDHGVDPDTDLLINFRYLVR
DYMKQSPPEPILVHCSAGVGRTGTFFIAIDRLIYQIENENTVDVYGVYDLRMHRPLMVQ
TEDQYVFLNQCVLDIVRSQKDSKVDLIYQNTTAMTIYENLAPVTTFGKTNFYIA

SEQ ID № 42: SFG.aCD19-CD8STK-CD28tmZ-2A-aGD2-HCH2CH3pvaa-dCD148

ATGAGCCTGCCCCGTGACCGCCCTGCTGCTGCCCCCTGGCCCTGCTGCTGCACGCCG
CCAGACCAGACATCCAGATGACCCAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGC
GACCGGGTGACCATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAAGT
GTACCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCCGGC
TGCACAGCGGCGTGCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTACAGC
CTGACCATCAGCAACCTGGAGCAGGAGGACATCGCCACCTACTTCTGCCAGCAGGG
CAACACCCTGCCCTACACCTTCGGAGGCGGCACCAAGCTGGAGATACCAAGGCCG
GAGGCGGAGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGG

CAGCGAGGTGAAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGCCTGGTGGCCCCAAGCCAGAGCC
 TGAGCGTGACCTGCACCGTGAGCGGCGTGAGCCTGCCCCGACTACGGCGTGAGCTGG
 ATCAGGCAGCCCCCACGGAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGA
 GACCACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACA
 5 GCAAGAGCCAGGTGTTCTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATC
 TACTACTGCGCCAAGCACTACTACTATGGCGGCAGCTACGCTATGGACTACTGGGG
 CCAGGGCACCAGCGTGACCGTGAGCTCAGATCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGAC
 CACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCG
 TGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGA
 10 TATCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGT
 AACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAG
 ACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGA
 CGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGG
 GGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAA
 15 AGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGG
 GGCAAGGGGACAGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTA
 CGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCTCCTCGCAGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTC
 TTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCCCGGGCCCATGGAGACCGACACCCTG
 CTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCAGGCAGCACCGGCCAGGTGCAGCTGCA
 20 GGAGTCTGGCCCAGGCCTGGTGAAGCCCAGCCAGACCCTGAGCATCACCTGCACCG
 TGAGCGGCTTCAGCCTGGCCAGCTACAACATCCACTGGGTGCGGCAGCCCCCAGGC
 AAGGGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGCTGGCGGCAGCACCAACTACAACAG
 CGCCCTGATGAGCCGGCTGACCATCAGCAAGGACAACAGCAAGAACCAGGTGTTCC
 TGAAGATGAGCAGCCTGACAGCCGCCGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGCGG
 25 AGCGACGACTACAGCTGGTTCGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAG
 CTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCAGCGAGAAC
 CAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCTTGAGCGCCAGCGTGGGCGACCGGGTGACCAT
 GACCTGCAGAGCCAGCAGCAGCGTGAGCAGCAGCTACCTGCACTGGTACCAGCAGA
 AGAGCGGCAAGGCCCCAAAGGTGTGGATCTACAGCACCAGCAACCTGGCCAGCGG
 30 CGTGCCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTACACCCTGACCATCA
 GCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCGGCTAC
 CCCATCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGTCGGATCCCGCCGA
 GCCCAAATCTCCTGACAAAATCACAACATGCCACCGTGCCCAGCACCTCCCGTGGC
 CGGCCCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCCTAAACCCAAAGGACACCCTCATGATCGCCCCG
 35 GACCCCTGAGGTCACATGCGTGTTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCA
 AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG
 GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA
 GGAAGTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAG
 CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG
 40 TACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTG
 CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC
 AACCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC
 TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
 CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCCCCTGCACAATCACTATACCCAGAAATCTCTGAG
 45 TCTGAGCCCAGGCAAGAAGGACCCCAAGGCGGTTTTTGGCTGTATCTTTGGTGCCCT
 GGTTATTGTGACTGTGGGAGGCTTCATCTTCTGGAGAAAGAAGAGGAAAGATGCAA
 AGAATAATGAAGTGTCTTTTCTCAAATTAAACCTAAAAAATCTAAGTTAATCAGAG
 TGGAGAATTTTGAGGCCTACTTCAAGAAGCAGCAAGCTGACTCCAAGTGTGGGTTC

GCAGAGGAATACGAAGATCTGAAGCTTGTTGGAATTAGTCAACCTAAATATGCAGC
 AGAACTGGCTGAGAATAGAGGAAAGAATCGCTATAATAATGTTCTGCCCTATGATA
 TTTCCCGTGTCAAACCTTTCCGGTCCAGACCCATTCAACGGATGACTACATCAATGCCA
 ACTACATGCCTGGCTACCACTCCAAGAAAGATTTTATTGCCACACAAGGACCTTTAC
 5 CGAACACTTTGAAAGATTTTGGCGTATGGTTTGGGAGAAAAATGTATATGCCATCA
 TTATGTTGACTAAATGTGTTGAACAGGGAAGAACCAAATGTGAGGAGTATTGGCCC
 TCCAAGCAGGCTCAGGACTATGGAGACATAACTGTGGCAATGACATCAGAAATTGT
 TCTTCCGGAATGGACCATCAGAGATTTACAGTGAAAAATATCCAGACAAGTGAGA
 GTCACCCTCTGAGACAGTTCCATTTACCTCCTGGCCAGACCACGGTGTTCCTCGACA
 10 CCACTGACCTGCTCATCAACTTCCGGTACCTCGTTCGTGACTACATGAAGCAGAGTC
 CTCCCGAATCGCCGATTCTGGTGCATTGCAGTGCTGGGGTCGGAAGGACGGGCACT
 TTCATTGCCATTGATCGTCTCATCTACCAGATAGAGAATGAGAACACCGTGGATGTG
 TATGGGATTGTGTATGACCTTCGAATGCATAGGCCTTTAATGGTGCAGACAGAGGA
 CCAGTATGTTTTCTCAATCAGTGTGTTTTGGATATTGTCAGATCCCAGAAAGACTC
 15 AAAAGTAGATCTTATCTACCAGAACACAACCTGCAATGACAATCTATGAAAACCTTG
 CGCCCGTGACCACATTTGGAAAGACCAATGGTTACATCGCCTAA

SEQ ID № 43: SFG.aCD19-CD8STK-CD28tmZ-2A-aCD5-HCH2CH3pvaa-dCD148

MSLPVTALLPLALLHAARPDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQ
 QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTF
 20 GGGTKLEITKAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGIVAPSQSLSVTCTVSGV
 SLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGSSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQ
 TDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
 PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIFWVLVVGGVLACYSLIVTVAFIIFWVRRVKFSRS
 ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ
 25 KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRRAEGRGSL
 LTCGDVEENPGPMETDTLLLWVLLLWVPGSTGQVTLKESGPGILKPSQTLSTCSFSGFS
 LSTSGMGVGVIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDVYYNPSLKNQLTISKDASRDQVFLKITN
 LDTADTATYYCVRRRATGTGFDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGNIVMTQSH
 KFMSTSVGDRVSIACKASQDVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWTSTRHTGVPDRFTGSG
 30 SGTDFTLTITNVQSEDLADYFCHQYNSYNTFGSGTRLELKRSDPAEPKSPDKTHTCPPCP
 APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
 VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKAVFGCIFGALVIV
 35 TVGGFIFWRKKRKDAKNNEVSFSQIKPKKSKLIRVENFEAYFKKQQADSNCGFEEYED
 LKLVGISQPKYAAELAENRGKNRYNNVLPYDISRVKLSVQTHSTDDYINANYMPGYHS
 KKDFIATQGPLPNTLKDFWRMVWEKNVYAIIMLTKEVEQGRTECEYWPQKQAQDYG
 DITVAMTSEIVLPEWTIRDFTVKNIQTSESHPLRQFHFTSWPDHGVPTDITLLINFRYLV
 DYMKGSPPEPILVHCSAGVGRGTGFIADRLIYQIENENTVDVYGIVYDLRMHRPLMVQ
 40 TEDQYVFLNQCVLDIVRSQKDSKVDLIYQNTTAMTIYENLAPVTTFGKTNGYIA

SEQ ID № 44: SFG.aCD19-CD8STK-CD28tmZ-2A-aCD5-HCH2CH3pvaa-dCD148

ATGAGCCTGCCCCGTGACCGCCCTGCTGCTGCCCCCTGGCCCTGCTGCTGCACGCCG
 CCAGACCAGACATCCAGATGACCCAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGC
 GACCGGGTGACCATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAAGT
 45 GTACCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCCGGC
 TGCACAGCGGCGTGCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTACAGC
 CTGACCATCAGCAACCTGGAGCAGGAGGACATCGCCACCTACTTCTGCCAGCAGGG
 CAACACCCTGCCCTACACCTTCGGAGGCGGCACCAAGCTGGAGATACCAAGGCCG

GAGGCGGAGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGG
 CAGCGAGGTGAAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGCCTGGTGGCCCCAAGCCAGAGCC
 TGAGCGTGACCTGCACCGTGAGCGGCGTGAGCCTGCCCGACTACGGCGTGAGCTGG
 ATCAGGCAGCCCCACGGAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGA
 5 GACCACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACA
 GCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATC
 TACTACTGCGCCAAGCACTACTACTATGGCGGCAGCTACGCTATGGACTACTGGGG
 CCAGGGCACCAGCGTGACCGTGAGCTCAGATCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGAC
 CACCAACACCGGCGCCACCACATCGCGTCGCAGCCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCG
 10 TGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGA
 TATCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGT
 AACAGTGGCCTTTATTATTTCTGGGTGAGGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAG
 ACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGA
 CGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGG
 15 GGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAA
 AGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGG
 GGCAAGGGGACAGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTA
 CGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCTCCTCGCAGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTC
 TTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCCCGGGCCCATGGAGACCGACACCCTG
 20 CTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCCGGCAGCACCGGCCAGGTGACCCTGAA
 GGAGAGCGGTCCCGGCATCCTGAAGCCCAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCAGCT
 TCAGCGGCTTCAGCCTGAGCACCAGCGGCATGGGCGTGGGCTGGATTTCGGCAGCCC
 AGCGGCAAGGGCCTGGAGTGGCTGGCCACATCTGGTGGGACGACGACGTGTACTA
 CAACCCCAGCCTGAAGAACCAGCTGACCATCAGCAAGGACGCCAGCCGGGACCAG
 25 GTGTTCTCTGAAGATCACCAACCTGGACACCGCCGACACCGCCACCTACTACTGCGTG
 CGGCGCCGGGCCACCGGCACCGGCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCCTGAC
 CGTGAGCAGCGGTGGCGGTGGCAGCGGCGGCGGCGGAAGCGGAGGTGGTGGCAGC
 AACATCGTGATGACCCAGAGCCACAAGTTCATGAGCACCAGCGTGGGCGACCGGGT
 GAGCATCGCCTGCAAGGCCAGCCAGGACGTGGGCACCGCCGTGGCCTGGTACCAGC
 30 AGAAGCCTGGCCAGAGCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGACCAGCACCCGGCACACC
 GGCGTGCCCGACCGGTTACCCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCAT
 CACCAACGTGCAGAGCGAGGACCTGGCCGACTACTTCTGCCACCAGTACAACAGCT
 ACAACACCTTCGGCAGCGGCACCCGGCTGGAGCTGAAGCGGTTCGGATCCCGCCGAG
 CCCAAATCTCCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTCCCGTGGCC
 35 GGCCCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCGCCCGG
 ACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAA
 GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG
 AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG
 GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGC
 40 CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT
 ACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGC
 CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA
 ACCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT
 TCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC
 45 TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCCCTGCACAATCACTATACCCAGAAATCTCTGAGT
 CTGAGCCCAGGCAAGAAGGACCCCAAGGCGGTTTTTGGCTGTATCTTTGGTGGCCTG
 GTTATTGTGACTGTGGGAGGCTTCATCTTCTGGAGAAAGAAGAGGAAAGATGCAAA
 GAATAATGAAGTGTCTTTTCTCAAATTAACCTAAAAAATCTAAGTTAATCAGAGT

GGAGAATTTTGAGGCCTACTTCAAGAAGCAGCAAGCTGACTCCAACTGTGGGTTCG
 CAGAGGAATACGAAGATCTGAAGCTTGTGGAATTAGTCAACCTAAATATGCAGCA
 GAACTGGCTGAGAATAGAGGAAAGAATCGCTATAATAATGTTCTGCCCTATGATAT
 TCCCCGTGTCAAACCTTTCGGTCCAGACCCATTCAACGGATGACTACATCAATGCCAA
 5 CTACATGCCTGGCTACCACTCCAAGAAAGATTTTATTGCCACACAAGGACCTTTACC
 GAACACTTTGAAAGATTTTGGCGTATGGTTTGGGAGAAAAATGTATATGCCATCAT
 TATGTTGACTAAATGTGTTGAACAGGGAAGAACCAATGTGAGGAGTATTGGCCCT
 CCAAGCAGGCTCAGGACTATGGAGACATAACTGTGGCAATGACATCAGAAATTGTT
 CTTCCGGAATGGACCATCAGAGATTTACAGTGAAAAATATCCAGACAAGTGAGAG
 10 TCACCTCTGAGACAGTTCCATTTACCTCCTGGCCAGACCACGGTGTTCGCGACAC
 CACTGACCTGCTCATCAACTTCCGGTACCTCGTTCGTGACTACATGAAGCAGAGTCC
 TCCCGAATCGCCGATTCTGGTGCATTGCAGTGCTGGGGTCGGAAGGACGGGCACTT
 TCATTGCCATTGATCGTCTCATCTACCAGATAGAGAATGAGAACACCGTGGATGTGT
 ATGGGATTGTGTATGACCTTCGAATGCATAGGCCTTTAATGGTGCAGACAGAGGAC
 15 CAGTATGTTTTCTCAATCAGTGTGTTTTGGATATTGTCAGATCCCAGAAAGACTCA
 AAAGTAGATCTTATCTACCAGAACACAACCTGCAATGACAATCTATGAAAACCTTGC
 GCCCGTGACCACATTTGGAAAGACCAATGGTTACATCGCCTAA

SEQ ID № 45: SFG.aCD19-CD8STK-CD28tmZ-2A-aEGFRvIII-HCH2CH3pvaa-dCD148

MSLPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTSSLSASLGDRVITISCRASQDISKYLNWYQ

20 QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTF
 GGGTKLEITKAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGV
 SLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQ
 TDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
 PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIFWVLVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRRVKFSRS
 25 ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ
 KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGLSTATKDTYDALHMQUALPPRRAEGRGSL
 LTCGDVEENPGPMETDLLLLWVLLLWVPGSTGQVKLQQSGGGLVKPGASLKLSCVTSG
 FTFRKFGMSWVRQTSDKRLEWVASISTGGYNTYYSDNVKGRFTISRENAKNTLYLQMS
 SLKSEDTALYYCTRGYSSTSYAMDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQS
 30 PASLSVATGEKVTIRCMTSTDIDDDMNWYQQKPGEPPKFLISEGNTLRPGVPSRFSSTG
 GTDFVFTIENTLSEVDYCLQSFNVPLTFGDGKLEIKRSDPAEPKSPDKTHTCPPCP
 APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
 VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLL
 35 YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKAVFGCIFGALVIV
 TVGGFIFWRKKRDKAKNNEVSFSQIKPKKSKLIRVENFEAYFKKQQADSNCGFEEYED
 LKLVGISQPKYAAELAENRGKNRYNNVLPYDISRVKLSVQTHSTDDYINANYMPGYHS
 KKDFIATQGPLPNTLKDFWRMVWEKNVYAIIMLTKEVEQGRTKCEEYWPSKQAQDYG
 DITVAMTSEIVLPEWTIRDFTVKNIQTSESHPLRQFHFTSWPDHGVDPDLDLLINFRYLVR
 40 DYMKQSPPEPILVHCSAGVGRGTGFIAIDRLIYQIENENTVDVYGIVYDLRMHRPLMVQ
 TEDQYVFLNQCVLDIVRSQKDSKVDLIYQNTTAMTIYENLAPVTTFGKTNGYIA

SEQ ID № 46: SFG.aCD19-CD8STK-CD28tmZ-2A-aEGFRvIII-HCH2CH3pvaa-dCD148

ATGAGCCTGCCCCGTGACCGCCCTGCTGCTGCCCCCTGGCCCTGCTGCTGCACGCCG
 CCAGACCAGACATCCAGATGACCCAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGC
 45 GACCGGGTGACCATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTG
 GTACCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCCGGC
 TGCACAGCGGCGTGCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTACAGC
 CTGACCATCAGCAACCTGGAGCAGGAGGACATCGCCACCTACTTCTGCCAGCAGGG

CAACACCCTGCCCTACACCTTCGGAGGCGGCACCAAGCTGGAGATCACCAAGGCCG
 GAGGCGGAGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGG
 CAGCGAGGTGAAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGCCTGGTGGCCCCAAGCCAGAGCC
 TGAGCGTGACCTGCACCGTGAGCGGCGTGAGCCTGCCCGACTACGGCGTGAGCTGG
 5 ATCAGGCAGCCCCACGGAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGA
 GACCACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACA
 GCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATC
 TACTACTGCGCCAAGCACTACTACTATGGCGGCAGCTACGCTATGGACTACTGGGG
 CCAGGGCACCAGCGTGACCGTGAGCTCAGATCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGAC
 10 CACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCG
 TGCCGCGCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGA
 TATCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGT
 AACAGTGGCCTTTATTATTTCTGGGTGAGGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAG
 ACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGA
 15 CGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCCTGAGATGG
 GGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAA
 AGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGG
 GGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTA
 CGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCTCCTCGCAGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTC
 20 TTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCCCGGGGCCATGGAGACCGACACCCTG
 CTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCCGGCAGCACCAGGCCAGGTGAAGCTGCA
 GCAGAGCGGCGGAGGCCTGGTGAAGCCCGGCGCCAGCCTGAAGCTGAGCTGCGTG
 ACCAGCGGCTTCACCTTCCGGAAGTTCGGCATGAGCTGGGTGCGGCAGACCAGCGA
 CAAGCGGCTGGAGTGGGTGGCCAGCATCAGCACCGGCGGCTACAACACCTACTACA
 25 GCGACAACGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGAGAACGCCAAGAACACCCT
 GTACCTGCAGATGAGCAGCCTGAAGAGCGAGGACACCGCCCTGTACTACTGCACCC
 GGGGCTACAGCAGCACCAGCTACGCTATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTG
 ACAGTGAGCAGCGGCGGAGGAGGCAGTGGTGGGGGTGGATCTGGCGGAGGTGGCA
 GCGACATCGAGCTGACCCAGAGCCCCGCCAGCCTGAGCGTGGCCACCGGCGAGAAG
 30 GTGACCATCCGGTGCATGACCAGCACCGACATCGACGACGACATGAAGTGGTACCA
 GCAGAAGCCCGGCGAGCCCCCAAAGTTCCTGATCAGCGAGGGCAACACCCTGCGGC
 CCGGCGTGCCAGCCGGTTCAGCAGCAGCGGCACCGGCACCGACTTCGTGTTACC
 ATCGAGAACACCCTGAGCGAGGACGTGGGCGACTACTACTGCCTGCAGAGCTTCAA
 CGTGCCCCTGACCTTCGCGCAGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGGTTCGGATCCCG
 35 CCGAGCCCAAATCTCCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTCCC
 GTGGCCGGCCCCGTGAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATC
 GCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA
 GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
 CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTG
 40 CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT
 CCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC
 AGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG
 ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA
 TGGGCAACCGGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCT
 45 CCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
 GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCCCTGCACAATCACTATACCCAGAAATCT
 CTGAGTCTGAGCCCAGGCAAGAAGGACCCCAAGGCGGTTTTTGGCTGTATCTTTGGT
 GCCCTGGTTATTGTGACTGTGGGAGGCTTCATCTTCTGGAGAAAGAAGAGGAAAGA

TGCAAAGAATAATGAAGTGTCTTTTCTCAAATTAAACCTAAAAAATCTAAGTTAAT
 CAGAGTGGAGAATTTTGAGGCCTACTTCAAGAAGCAGCAAGCTGACTCCAACCTGTG
 GGTTCGCAGAGGAATACGAAGATCTGAAGCTTGTTGGAATTAGTCAACCTAAATAT
 GCAGCAGAACTGGCTGAGAATAGAGGAAAGAATCGCTATAATAATGTTCTGCCCTA
 5 TGATATTTCCCGTGTCAAACCTTTCGGTCCAGACCCATTCAACGGATGACTACATCAA
 TGCCAACTACATGCCTGGCTACCACTCCAAGAAAGATTTTATTGCCACACAAGGACC
 TTTACCGAACACTTTGAAAGATTTTGGCGTATGGTTTGGGAGAAAAATGTATATGC
 CATCATTTATGTTGACTAAATGTGTTGAACAGGGAAGAACCAAATGTGAGGAGTATT
 GGCCCTCCAAGCAGGCTCAGGACTATGGAGACATAACTGTGGCAATGACATCAGAA
 10 ATTGTTCTTCCGGAATGGACCATCAGAGATTTACAGTGAAAAATATCCAGACAAG
 TGAGAGTCACCCTCTGAGACAGTTCATTTACCTCCTGGCCAGACCACGGTGTTC
 CGACACCACTGACCTGCTCATCAACTTCCGGTACCTCGTTCGTGACTACATGAAGCA
 GAGTCCTCCCGAATCGCCGATTCTGGTGCATTGCAGTGCTGGGGTTCGGAAGGACGG
 GCACTTTCATTGCCATTGATCGTCTCATCTACCAGATAGAGAATGAGAACACCGTGG
 15 ATGTGTATGGGATTGTGTATGACCTTCGAATGCATAGGCCTTTAATGGTGCAGACAG
 AGGACCAGTATGTTTTCTCAATCAGTGTGTTTGGGATATTGTCAGATCCCAGAAAG
 ACTCAAAAGTAGATCTTATCTACCAGAACACAACCTGCAATGACAATCTATGAAAAC
 CTTGCGCCCCGTGACCACATTTGGAAAGACCAATGGTTACATCGCCTAA

Пример 11: разработка и конструкция CAR на основе APRIL.

20 APRIL в его природной форме представляет собой секретируемый белок II типа. Использование APRIL в качестве ВСМА связывающего домена для CAR требует превращения этого секретируемого белка II типа в связанный с мембраной белок I типа, и для этого белок должен быть стабильным и сохранять связывание с ВСМА в этой форме. Для того чтобы создавать возможно подходящие молекулы, дальний
 25 аминоконцев APRIL удаляли для того, чтобы удалять связывание с протеогликанами. Затем добавляли сигнальный пептид для того, чтобы направлять появляющийся белок в эндоплазматический ретикулум, и таким образом, на клеточную поверхность. Также, поскольку свойства используемого спейсера могут менять функционирование CAR, тестировали три различных спейсерных доменов: создавали CAR на основе APRIL,
 30 содержащий (i) спейсер IgG1 человека, измененный для того, чтобы удалять Fc связывающие мотивы; (ii) «стебель» CD8; и (iii) отдельно шарнир IgG1 (рисунок на фиг. 25 и аминокислотные последовательности на фиг. 26). Эти CAR экспрессировали в бицистронном ретровирусном векторе (фиг. 27А) с тем, чтобы маркерный белок - усеченный CD34 можно было совместно экспрессировать в качестве удобного
 35 маркерного гена.

Пример 12: экспрессия и функционирование CAR на основе APRIL.

Цель этого исследования состояла в том, чтобы тестировать экспрессию сконструированных CAR на основе APRIL на клеточной поверхности и формирует ли укладка APRIL нативный белок. Т-клетки трансдуцировали этими конструкциями с
 40 различными CAR и окрашивали с использованием коммерчески доступного mAb против APRIL наряду с окрашиванием по маркерному гену и анализировали с помощью проточной цитометрии. Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 27В, где на график нанесено связывание APRIL в зависимости от флуоресценции маркерного гена. Эти данные показывают, что в этом формате CAR на основе APRIL
 45 экспрессированы на клеточной поверхности и APRIL укладывается достаточно, чтобы быть распознанным с помощью mAb против APRIL.

Затем определяли, может ли APRIL в этом формате распознавать ВСМА и TACI. Рекомбинантные ВСМА и TACI создавали в виде слитных белков с IgG2a-Fc мыши. Эти

рекомбинантные белки инкубировали с трансдуцированными Т-клетками. После этого клетки промывали и окрашивали антимышиным антителом, конъюгированным с флуорофором, и антителом для обнаружения маркерного гена, конъюгированным с другим флуорофором. Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии и результаты представлены на фиг. 27С. Различные CAR способны связывать как ВСМА, так и ТАСІ. К удивлению, CAR способны связывать ВСМА лучше, чем ТАСІ. Также, к удивлению, CAR со «стеблем» CD8 или шарнирным IgG1 спейсером способны лучше связывать ВСМА и ТАСІ, чем CAR с Fc спейсером.

Пример 13: химерные антигенные рецепторы на основе APRIL активны против экспрессирующих ВСМА клеток

Т-клетки от нормальных доноров трансдуцировали различными APRIL CAR и тестировали на клетках SupT1 или дикого типа или сконструированных для того, чтобы экспрессировать ВСМА и ТАСІ. Использовали несколько различных анализов для того, чтобы определять функцию. Осуществляли классический анализ на высвобождение хрома. Здесь клетки-мишени (клетки SupT1) метили с использованием ^{51}Cr и смешивали с эффекторами (трансдуцированные Т-клетки) в различных соотношениях. Лизис клеток-мишеней определяли посредством подсчета ^{51}Cr в супернатанте совместной культуры (на фиг. 28А представлены кумулятивные данные).

Кроме того, супернатант от Т-клеток, которые культивировали 1:1 с клетками SupT1, анализировали с помощью ELISA на интерферон- γ (на фиг. 28В представлены кумулятивные данные). Также осуществляли измерение размножения Т-клеток после одной недели совместного культивирования с клетками SupT1 (фиг. 28С). Т-клетки считали с помощью проточного цитометра, который калибровали с использованием счетных гранул. Эти экспериментальные данные показывают, что CAR на основе APRIL могут уничтожать мишени, экспрессирующие ВСМА. Кроме того, эти данные показывают, что CAR, основанные на «стебле» CD8 или шарнире IgG1, работали лучше, чем CAR на основе Fc-pvaa.

Пример 14: функциональный анализ логического элемента И в первичных клетках PBMC выделяли из крови и стимулировали с использованием РНА и ІL-2. Двумя сутками позже клетки трансдуцировали в покрытых ретронектином планшетах с использованием ретровируса, содержащего конструкцию логического элемента И CD19:CD33. В сутки 5 уровень экспрессии двух CAR, транслируемых конструкцией логического элемента И, оценивали через проточную цитометрию, и клетки обедняли по CD56+ клеткам (преимущественно естественные киллерные клетки). В сутки 6 PBMC помещали в совместную культуру с клетками-мишенями в соотношении эффекторы к клеткам-мишеням 1:2. В сутки 8 супернатант собирали и анализировали на секрецию IFN- γ с помощью ELISA (фиг. 29).

Эти данные демонстрируют, что логический элемент И функционирует в первичных клетках.

Все публикации, указанные в приведенном выше описании, включены в настоящий документ посредством ссылки. Различные модификации и вариации описанных способов и систем по изобретению будут очевидны специалистам в данной области, не отступая от объема и сущности изобретения. Несмотря на то, что изобретение описано применительно к конкретным предпочтительным вариантам осуществления, следует понимать, что изобретение, как заявлено, не должно быть чрезмерно ограничено такими конкретными вариантами осуществления. В действительности, предусмотрено, что различные модификации описанных способов осуществления изобретения, которые очевидны специалистам в молекулярной биологии, клеточной биологии или связанных

областях, включены в объем следующей формулы изобретения.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> UCL Business PLC
 <120> Т-клетка
 5 <130> P103294PCT1
 <150> GB 1410934.2
 <151> 2014-06-19
 <160> 53
 <170> PatentIn version 3.5
 10 <210> 1
 <211> 1129
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 15 <223> Химерный антигенный рецептор (CAR)
 <400> 1
 Met Ser Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu
 20 20 25 30
 Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 35 40 45
 Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr
 50 55 60
 25 Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
 85 90 95
 Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
 30 100 105 110
 Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr
 115 120 125
 Lys Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140
 35 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly
 145 150 155 160
 Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly
 165 170 175
 Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg
 40 180 185 190
 Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr
 195 200 205
 Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser
 210 215 220
 45 Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr
 225 230 235 240
 Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala
 245 250 255

RU 2717984 C2

	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Asp	Pro	
					260				265						270		
	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	
					275				280						285		
5	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	
					290				295						300		
	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Phe	Trp	
	305					310					315					320	
	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	
10					325					330					335		
	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	
					340					345					350		
	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	
					355				360						365		
15	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	
					370				375						380		
	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	
	385					390					395					400	
	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	
20					405					410					415		
	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	
					420					425					430		
	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	
					435				440						445		
25	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	Arg	Ala	Glu	Gly	Arg	Gly	
					450				455						460		
	Ser	Leu	Leu	Thr	Cys	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Ala	
	465					470					475					480	
	Val	Pro	Thr	Gln	Val	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Thr	Asp	Ala	
30					485					490					495		
	Arg	Cys	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	
					500				505						510		
	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asp	Ile	Tyr	
					515				520						525		
35	Phe	Asn	Leu	Val	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	
					530				535						540		
	Leu	Ile	Tyr	Asp	Thr	Asn	Arg	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	
	545					550					555					560	
	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	
40					565					570					575		
	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Tyr	Lys	Asn	Tyr	
					580					585					590		
	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ser	Gly	
					595				600						605		
45	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
					610				615						620		
	Gly	Gly	Ser	Arg	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	
	625					630					635					640	

RU 2717984 C2

	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe
					645					650					655	
	Thr	Leu	Ser	Asn	Tyr	Gly	Met	His	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys
				660					665					670		
5	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ser	Ile	Ser	Leu	Asn	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr
			675					680				685				
	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala
		690					695					700				
	Lys	Ser	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr
10	705					710				715					720	
	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Gln	Asp	Ala	Tyr	Thr	Gly	Gly	Tyr	Phe
				725					730					735		
	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Met	Asp	Pro
				740					745					750		
15	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Pro	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
		755					760					765				
	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro
		770				775					780					
	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ala	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val
20	785					790				795					800	
	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val
				805					810					815		
	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln
			820					825				830				
25	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln
		835					840				845					
	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala
		850				855					860					
	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro
30	865				870					875					880	
	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr
				885					890					895		
	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser
			900					905				910				
35	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr
		915					920					925				
	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr
		930				935					940					
	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe
40	945				950					955					960	
	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys
				965				970				975				
	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Lys	Asp	Pro	Lys	Phe	Trp	Val	Leu
			980					985				990				
45	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val
		995					1000					1005				
	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Ser	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	
	1010						1015					1020				

RU 2717984 C2

	Ser Ala	Asp Ala	Pro Ala	Tyr	Gln Gln	Gly Gln	Asn	Gln Leu	Tyr		
	1025			1030			1035				
	Asn Glu	Leu Asn	Leu Gly	Arg	Arg Glu	Glu Tyr	Asp	Val Leu	Asp		
	1040			1045			1050				
5	Lys Arg	Arg Gly	Arg Asp	Pro	Glu Met	Gly Gly	Lys	Pro Arg	Arg		
	1055			1060			1065				
	Lys Asn	Pro Gln	Glu Gly	Leu	Tyr Asn	Glu Leu	Gln	Lys Asp	Lys		
	1070			1075			1080				
	Met Ala	Glu Ala	Tyr Ser	Glu	Ile Gly	Met Lys	Gly	Glu Arg	Arg		
10	1085			1090			1095				
	Arg Gly	Lys Gly	His Asp	Gly	Leu Tyr	Gln Gly	Leu	Ser Thr	Ala		
	1100			1105			1110				
	Thr Lys	Asp Thr	Tyr Asp	Ala	Leu His	Met Gln	Ala	Leu Pro	Pro		
	1115			1120			1125				
15	Arg										
	<210>	2									
	<211>	1350									
	<212>	Белок									
	<213>	Искусственная последовательность									
20	<220>										
	<223>	Химерный антигенный рецептор (CAR)									
	<400>	2									
	Met Ser	Leu Pro	Val Thr	Ala Leu	Leu Leu	Leu Pro	Leu Ala	Leu Leu	Leu		
	1		5			10		15			
25	His Ala	Ala Arg	Pro Asp	Ile Gln	Met Thr	Gln Thr	Thr Thr	Ser Ser	Leu		
		20		25			30				
	Ser Ala	Ser Leu	Gly Asp	Arg Val	Thr Ile	Ser Cys	Arg Ala	Ser Gln			
		35		40			45				
	Asp Ile	Ser Lys	Tyr Leu	Asn Trp	Tyr Gln	Gln Lys	Pro Asp	Gly Thr			
30		50		55			60				
	Val Lys	Leu Leu	Ile Tyr	His Thr	Ser Arg	Leu His	Ser Gly	Val Pro			
	65		70			75		80			
	Ser Arg	Phe Ser	Gly Ser	Gly Ser	Gly Thr	Asp Tyr	Ser Leu	Thr Ile			
		85		90			95				
35	Ser Asn	Leu Glu	Gln Glu	Asp Ile	Ala Thr	Tyr Phe	Cys Gln	Gln Gly			
		100		105			110				
	Asn Thr	Leu Pro	Tyr Thr	Phe Gly	Gly Gly	Gly Thr	Lys Leu	Glu Ile	Thr		
		115		120			125				
	Lys Ala	Gly Gly	Gly Gly	Ser Gly	Gly Gly	Gly Ser	Gly Gly	Gly Gly			
40		130		135			140				
	Ser Gly	Gly Gly	Gly Ser	Glu Val	Lys Leu	Gln Glu	Ser Gly	Pro Gly			
	145		150			155		160			
	Leu Val	Ala Pro	Ser Gln	Ser Leu	Ser Val	Thr Cys	Thr Val	Ser Gly			
		165		170			175				
45	Val Ser	Leu Pro	Asp Tyr	Gly Val	Ser Trp	Ile Arg	Gln Pro	Pro Arg			
		180		185			190				
	Lys Gly	Leu Glu	Trp Leu	Gly Val	Ile Trp	Gly Ser	Glu Thr	Thr Tyr			
		195		200			205				

RU 2717984 C2

	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ile	Lys	Asp	Asn	Ser	
	210						215					220					
	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Thr	Asp	Asp	Thr	
	225					230					235					240	
5	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	
					245					250					255		
	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Asp	Pro	
				260				265						270			
	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	
10				275				280						285			
	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	
	290						295					300					
	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Phe	Trp	
	305					310					315					320	
15	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	
					325					330					335		
	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	
				340				345						350			
	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	
20				355				360					365				
	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	
	370					375						380					
	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	
	385					390					395					400	
25	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	
					405					410					415		
	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	
				420				425					430				
	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	
30				435				440					445				
	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	Arg	Ala	Glu	Gly	Arg	Gly	
	450					455						460					
	Ser	Leu	Leu	Thr	Cys	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Ala	
	465					470					475					480	
35	Val	Pro	Thr	Gln	Val	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Thr	Asp	Ala	
				485						490					495		
	Arg	Cys	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	
				500				505					510				
	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asp	Ile	Tyr	
40				515				520					525				
	Phe	Asn	Leu	Val	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	
	530					535						540					
	Leu	Ile	Tyr	Asp	Thr	Asn	Arg	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	
	545					550					555					560	
45	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	
					565					570					575		
	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Tyr	Lys	Asn	Tyr	
				580				585					590				

RU 2717984 C2

	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ser	Gly	
					595			600					605				
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
					610			615					620				
5	Gly	Gly	Ser	Arg	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	
						625		630			635					640	
	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	
						645				650					655		
	Thr	Leu	Ser	Asn	Tyr	Gly	Met	His	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	
10					660				665					670			
	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ser	Ile	Ser	Leu	Asn	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	
					675			680						685			
	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	
						690		695					700				
15	Lys	Ser	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	
						705		710				715				720	
	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Gln	Asp	Ala	Tyr	Thr	Gly	Gly	Tyr	Phe	
						725				730					735		
	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Met	Asp	Pro	
20					740				745					750			
	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Pro	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	
					755			760						765			
	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	
					770			775				780					
25	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ala	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	
						785		790				795				800	
	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	
						805				810					815		
	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	
30					820				825					830			
	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	
					835			840						845			
	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	
					850			855				860					
35	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	
						865		870				875				880	
	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	
						885				890				895			
	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	
40					900				905					910			
	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	
					915			920					925				
	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	
					930			935					940				
45	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	
					945			950				955				960	
	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	
					965				970						975		

RU 2 717 984 C2

	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Lys	Asp	Pro	Lys	Ala	Val	Phe	Gly
	980				985				990							
	Cys	Ile	Phe	Gly	Ala	Leu	Val	Ile	Val	Thr	Val	Gly	Gly	Phe	Ile	Phe
	995				1000				1005							
5	Trp	Arg	Lys	Lys	Arg	Lys	Asp	Ala	Lys	Asn	Asn	Glu	Val	Ser	Phe	
	1010				1015				1020							
	Ser	Gln	Ile	Lys	Pro	Lys	Lys	Ser	Lys	Leu	Ile	Arg	Val	Glu	Asn	
	1025				1030				1035							
	Phe	Glu	Ala	Tyr	Phe	Lys	Lys	Gln	Gln	Ala	Asp	Ser	Asn	Cys	Gly	
10	1040				1045				1050							
	Phe	Ala	Glu	Glu	Tyr	Glu	Asp	Leu	Lys	Leu	Val	Gly	Ile	Ser	Gln	
	1055				1060				1065							
	Pro	Lys	Tyr	Ala	Ala	Glu	Leu	Ala	Glu	Asn	Arg	Gly	Lys	Asn	Arg	
	1070				1075				1080							
15	Tyr	Asn	Asn	Val	Leu	Pro	Tyr	Asp	Ile	Ser	Arg	Val	Lys	Leu	Ser	
	1085				1090				1095							
	Val	Gln	Thr	His	Ser	Thr	Asp	Asp	Tyr	Ile	Asn	Ala	Asn	Tyr	Met	
	1100				1105				1110							
	Pro	Gly	Tyr	His	Ser	Lys	Lys	Asp	Phe	Ile	Ala	Thr	Gln	Gly	Pro	
20	1115				1120				1125							
	Leu	Pro	Asn	Thr	Leu	Lys	Asp	Phe	Trp	Arg	Met	Val	Trp	Glu	Lys	
	1130				1135				1140							
	Asn	Val	Tyr	Ala	Ile	Ile	Met	Leu	Thr	Lys	Cys	Val	Glu	Gln	Gly	
	1145				1150				1155							
25	Arg	Thr	Lys	Cys	Glu	Glu	Tyr	Trp	Pro	Ser	Lys	Gln	Ala	Gln	Asp	
	1160				1165				1170							
	Tyr	Gly	Asp	Ile	Thr	Val	Ala	Met	Thr	Ser	Glu	Ile	Val	Leu	Pro	
	1175				1180				1185							
	Glu	Trp	Thr	Ile	Arg	Asp	Phe	Thr	Val	Lys	Asn	Ile	Gln	Thr	Ser	
30	1190				1195				1200							
	Glu	Ser	His	Pro	Leu	Arg	Gln	Phe	His	Phe	Thr	Ser	Trp	Pro	Asp	
	1205				1210				1215							
	His	Gly	Val	Pro	Asp	Thr	Thr	Asp	Leu	Leu	Ile	Asn	Phe	Arg	Tyr	
	1220				1225				1230							
35	Leu	Val	Arg	Asp	Tyr	Met	Lys	Gln	Ser	Pro	Pro	Glu	Ser	Pro	Ile	
	1235				1240				1245							
	Leu	Val	His	Cys	Ser	Ala	Gly	Val	Gly	Arg	Thr	Gly	Thr	Phe	Ile	
	1250				1255				1260							
	Ala	Ile	Asp	Arg	Leu	Ile	Tyr	Gln	Ile	Glu	Asn	Glu	Asn	Thr	Val	
40	1265				1270				1275							
	Asp	Val	Tyr	Gly	Ile	Val	Tyr	Asp	Leu	Arg	Met	His	Arg	Pro	Leu	
	1280				1285				1290							
	Met	Val	Gln	Thr	Glu	Asp	Gln	Tyr	Val	Phe	Leu	Asn	Gln	Cys	Val	
	1295				1300				1305							
45	Leu	Asp	Ile	Val	Arg	Ser	Gln	Lys	Asp	Ser	Lys	Val	Asp	Leu	Ile	
	1310				1315				1320							
	Tyr	Gln	Asn	Thr	Thr	Ala	Met	Thr	Ile	Tyr	Glu	Asn	Leu	Ala	Pro	
	1325				1330				1335							

Val Thr Thr Phe Gly Lys Thr Asn Gly Tyr Ile Ala
1340 1345 1350
<210> 3
<211> 1717
5 <212> Белок
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Химерный антигенный рецептор (CAR)
<400> 3
10 Met Ser Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu
20 25 30
Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln
15 35 40 45
Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr
50 55 60
Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
65 70 75 80
20 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95
Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
100 105 110
Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr
25 115 120 125
Lys Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly
145 150 155 160
30 Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly
165 170 175
Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg
180 185 190
Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr
35 195 200 205
Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser
210 215 220
Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr
225 230 235 240
40 Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala
245 250 255
Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Asp Pro
260 265 270
Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
45 275 280 285
Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
290 295 300
Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Phe Trp

RU 2717984 C2

	305				310				315				320			
	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val
					325				330					335		
	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg
5				340				345					350			
	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn
			355					360				365				
	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg
			370					375				380				
10	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro
	385					390				395				400		
	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala
				405						410				415		
	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His
15				420				425				430				
	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp
			435					440				445				
	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	Arg	Ala	Glu	Gly	Arg	Gly
			450					455				460				
20	Ser	Leu	Leu	Thr	Cys	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Ala
	465					470					475				480	
	Val	Pro	Thr	Gln	Val	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Thr	Asp	Ala
				485						490				495		
	Arg	Cys	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser
25				500				505					510			
	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asp	Ile	Tyr
			515					520					525			
	Phe	Asn	Leu	Val	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu
			530				535					540				
30	Leu	Ile	Tyr	Asp	Thr	Asn	Arg	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe
	545					550					555				560	
	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu
				565				570					575			
	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Tyr	Lys	Asn	Tyr
35				580				585					590			
	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ser	Gly
			595					600					605			
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
			610				615					620				
40	Gly	Gly	Ser	Arg	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu
	625					630					635				640	
	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe
				645				650					655			
	Thr	Leu	Ser	Asn	Tyr	Gly	Met	His	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys
45				660				665					670			
	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ser	Ile	Ser	Leu	Asn	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr
			675					680				685				
	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala

RU 2717984 C2

	690		695		700												
	Lys	Ser	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	
	705						710					715					720
	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Gln	Asp	Ala	Tyr	Thr	Gly	Gly	Tyr	Phe	
5					725					730					735		
	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Met	Asp	Pro	
				740					745					750			
	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Pro	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	
				755				760						765			
10	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	
	770						775							780			
	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ala	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	
	785					790					795					800	
	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	
15					805					810					815		
	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	
				820					825					830			
	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	
				835				840						845			
20	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	
	850						855						860				
	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	
	865					870					875					880	
	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	
25					885					890					895		
	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	
				900					905					910			
	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	
				915				920					925				
30	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	
	930						935						940				
	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	
	945					950					955					960	
	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	
35					965					970					975		
	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Lys	Asp	Pro	Lys	Ala	Leu	Ile	Ala	
				980					985					990			
	Phe	Leu	Ala	Phe	Leu	Ile	Ile	Val	Thr	Ser	Ile	Ala	Leu	Leu	Val	Val	
				995				1000						1005			
40	Leu	Tyr	Lys	Ile	Tyr	Asp	Leu	His	Lys	Lys	Arg	Ser	Cys	Asn	Leu		
	1010						1015						1020				
	Asp	Glu	Gln	Gln	Glu	Leu	Val	Glu	Arg	Asp	Asp	Glu	Lys	Gln	Leu		
	1025						1030						1035				
	Met	Asn	Val	Glu	Pro	Ile	His	Ala	Asp	Ile	Leu	Leu	Glu	Thr	Tyr		
45							1040						1045			1050	
	Lys	Arg	Lys	Ile	Ala	Asp	Glu	Gly	Arg	Leu	Phe	Leu	Ala	Glu	Phe		
	1055						1060						1065				
	Gln	Ser	Ile	Pro	Arg	Val	Phe	Ser	Lys	Phe	Pro	Ile	Lys	Glu	Ala		

RU 2717984 C2

	1070		1075		1080
	Arg Lys Pro Phe Asn Gln Asn	Lys Asn Arg Tyr Val	Asp Ile Leu		
	1085		1090		1095
	Pro Tyr Asp Tyr Asn Arg Val	Glu Leu Ser Glu Ile	Asn Gly Asp		
5	1100		1105		1110
	Ala Gly Ser Asn Tyr Ile Asn	Ala Ser Tyr Ile Asp	Gly Phe Lys		
	1115		1120		1125
	Glu Pro Arg Lys Tyr Ile Ala	Ala Gln Gly Pro Arg	Asp Glu Thr		
	1130		1135		1140
10	Val Asp Asp Phe Trp Arg Met	Ile Trp Glu Gln Lys	Ala Thr Val		
	1145		1150		1155
	Ile Val Met Val Thr Arg Cys	Glu Glu Gly Asn Arg	Asn Lys Cys		
	1160		1165		1170
	Ala Glu Tyr Trp Pro Ser Met	Glu Glu Gly Thr Arg	Ala Phe Gly		
15	1175		1180		1185
	Asp Val Val Val Lys Ile Asn	Gln His Lys Arg Cys	Pro Asp Tyr		
	1190		1195		1200
	Ile Ile Gln Lys Leu Asn Ile	Val Asn Lys Lys Glu	Lys Ala Thr		
	1205		1210		1215
20	Gly Arg Glu Val Thr His Ile	Gln Phe Thr Ser Trp	Pro Asp His		
	1220		1225		1230
	Gly Val Pro Glu Asp Pro His	Leu Leu Leu Lys Leu	Arg Arg Arg		
	1235		1240		1245
	Val Asn Ala Phe Ser Asn Phe	Phe Ser Gly Pro Ile	Val Val His		
25	1250		1255		1260
	Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg	Thr Gly Thr Tyr Ile	Gly Ile Asp		
	1265		1270		1275
	Ala Met Leu Glu Gly Leu Glu	Ala Glu Asn Lys Val	Asp Val Tyr		
	1280		1285		1290
30	Gly Tyr Val Val Lys Leu Arg	Arg Gln Arg Cys Leu	Met Val Gln		
	1295		1300		1305
	Val Glu Ala Gln Tyr Ile Leu	Ile His Gln Ala Leu	Val Glu Tyr		
	1310		1315		1320
	Asn Gln Phe Gly Glu Thr Glu	Val Asn Leu Ser Glu	Leu His Pro		
35	1325		1330		1335
	Tyr Leu His Asn Met Lys Lys	Arg Asp Pro Pro Ser	Glu Pro Ser		
	1340		1345		1350
	Pro Leu Glu Ala Glu Phe Gln	Arg Leu Pro Ser Tyr	Arg Ser Trp		
	1355		1360		1365
40	Arg Thr Gln His Ile Gly Asn	Gln Glu Glu Asn Lys	Ser Lys Asn		
	1370		1375		1380
	Arg Asn Ser Asn Val Ile Pro	Tyr Asp Tyr Asn Arg	Val Pro Leu		
	1385		1390		1395
	Lys His Glu Leu Glu Met Ser	Lys Glu Ser Glu His	Asp Ser Asp		
45	1400		1405		1410
	Glu Ser Ser Asp Asp Asp Ser	Asp Ser Glu Glu Pro	Ser Lys Tyr		
	1415		1420		1425
	Ile Asn Ala Ser Phe Ile Met	Ser Tyr Trp Lys Pro	Glu Val Met		

RU 2717984 C2

	1430		1435		1440
	Ile Ala Ala Gln Gly Pro Leu	Lys Glu Thr Ile Gly	Asp Phe Trp		
	1445		1450		1455
	Gln Met Ile Phe Gln Arg Lys	Val Lys Val Ile Val	Met Leu Thr		
5	1460		1465		1470
	Glu Leu Lys His Gly Asp Gln	Glu Ile Cys Ala Gln	Tyr Trp Gly		
	1475		1480		1485
	Glu Gly Lys Gln Thr Tyr Gly	Asp Ile Glu Val Asp	Leu Lys Asp		
	1490		1495		1500
10	Thr Asp Lys Ser Ser Thr Tyr	Thr Leu Arg Val Phe	Glu Leu Arg		
	1505		1510		1515
	His Ser Lys Arg Lys Asp Ser	Arg Thr Val Tyr Gln	Tyr Gln Tyr		
	1520		1525		1530
	Thr Asn Trp Ser Val Glu Gln	Leu Pro Ala Glu Pro	Lys Glu Leu		
15	1535		1540		1545
	Ile Ser Met Ile Gln Val Val	Lys Gln Lys Leu Pro	Gln Lys Asn		
	1550		1555		1560
	Ser Ser Glu Gly Asn Lys His	His Lys Ser Thr Pro	Leu Leu Ile		
	1565		1570		1575
20	His Cys Arg Asp Gly Ser Gln	Gln Thr Gly Ile Phe	Cys Ala Leu		
	1580		1585		1590
	Leu Asn Leu Leu Glu Ser Ala	Glu Thr Glu Glu Val	Val Asp Ile		
	1595		1600		1605
	Phe Gln Val Val Lys Ala Leu	Arg Lys Ala Arg Pro	Gly Met Val		
25	1610		1615		1620
	Ser Thr Phe Glu Gln Tyr Gln	Phe Leu Tyr Asp Val	Ile Ala Ser		
	1625		1630		1635
	Thr Tyr Pro Ala Gln Asn Gly	Gln Val Lys Lys Asn	Asn His Gln		
	1640		1645		1650
30	Glu Asp Lys Ile Glu Phe Asp	Asn Glu Val Asp Lys	Val Lys Gln		
	1655		1660		1665
	Asp Ala Asn Cys Val Asn Pro	Leu Gly Ala Pro Glu	Lys Leu Pro		
	1670		1675		1680
	Glu Ala Lys Glu Gln Ala Glu	Gly Ser Glu Pro Thr	Ser Gly Thr		
35	1685		1690		1695
	Glu Gly Pro Glu His Ser Val	Asn Gly Pro Ala Ser	Pro Ala Leu		
	1700		1705		1710
	Asn Gln Gly Ser				
	1715				
40	<210> 4				
	<211> 1114				
	<212> Белок				
	<213> Искусственная последовательность				
	<220>				
45	<223> Химерный антигенный рецептор (CAR)				
	<400> 4				
	Met Ser Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu				
	1	5	10	15	

RU 2717984 C2

	His	Ala	Ala	Arg	Pro	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Ser	Leu
				20					25					30		
	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln
				35				40					45			
5	Asp	Ile	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr
		50					55					60				
	Val	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	His	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro
	65					70					75					80
	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile
10					85					90					95	
	Ser	Asn	Leu	Glu	Gln	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly
				100					105					110		
	Asn	Thr	Leu	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Thr
				115				120					125			
15	Lys	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
		130					135					140				
	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly
	145					150					155					160
	Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly
20					165					170					175	
	Val	Ser	Leu	Pro	Asp	Tyr	Gly	Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Arg
				180					185					190		
	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Tyr
		195					200					205				
25	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ile	Lys	Asp	Asn	Ser
		210					215					220				
	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Thr	Asp	Asp	Thr
	225					230					235					240
	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala
30					245					250					255	
	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Asp	Pro
				260					265					270		
	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala
				275				280					285			
35	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly
		290					295					300				
	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Phe	Trp
	305					310					315					320
	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val
40					325					330					335	
	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg
				340				345					350			
	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn
				355				360				365				
45	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg
		370					375				380					
	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro
	385					390					395					400

RU 2717984 C2

	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	
					405					410					415		
	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	
				420					425					430			
5	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	
			435					440					445				
	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	Arg	Ala	Glu	Gly	Arg	Gly	
			450					455					460				
	Ser	Leu	Leu	Thr	Cys	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Ala	
10	465					470					475					480	
	Val	Pro	Thr	Gln	Val	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Thr	Asp	Ala	
				485						490					495		
	Arg	Cys	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	
				500					505					510			
15	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asp	Ile	Tyr	
			515					520					525				
	Phe	Asn	Leu	Val	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	
			530				535					540					
	Leu	Ile	Tyr	Asp	Thr	Asn	Arg	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	
20	545					550					555					560	
	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	
					565					570					575		
	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Tyr	Lys	Asn	Tyr	
				580					585				590				
25	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ser	Gly	
			595					600					605				
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
			610				615					620					
	Gly	Gly	Ser	Arg	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	
30	625					630					635					640	
	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	
					645					650					655		
	Thr	Leu	Ser	Asn	Tyr	Gly	Met	His	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	
				660					665				670				
35	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ser	Ile	Ser	Leu	Asn	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	
			675					680					685				
	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	
			690				695					700					
	Lys	Ser	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	
40	705					710					715					720	
	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Gln	Asp	Ala	Tyr	Thr	Gly	Gly	Tyr	Phe	
					725					730					735		
	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Met	Asp	Pro	
				740					745					750			
45	Ala	Thr	Thr	Thr	Lys	Pro	Val	Leu	Arg	Thr	Pro	Ser	Pro	Val	His	Pro	
			755					760					765				
	Thr	Gly	Thr	Ser	Gln	Pro	Gln	Arg	Pro	Glu	Asp	Cys	Arg	Pro	Arg	Gly	
			770				775					780					

RU 2717984 C2

	Ser Val Lys Gly Thr Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Trp Ala	
	785	790 795 800
	Pro Leu Ala Gly Ile Cys Val Ala Leu Leu Leu Ser Leu Ile Ile Thr	
		805 810 815
5	Leu Ile Cys Tyr His Arg Ser Arg Lys Arg Val Cys Lys Ser Gly Gly	
		820 825 830
	Gly Ser Phe Trp Glu Glu Phe Glu Ser Leu Gln Lys Gln Glu Val Lys	
		835 840 845
	Asn Leu His Gln Arg Leu Glu Gly Gln Arg Pro Glu Asn Lys Gly Lys	
10		850 855 860
	Asn Arg Tyr Lys Asn Ile Leu Pro Phe Asp His Ser Arg Val Ile Leu	
		865 870 875 880
	Gln Gly Arg Asp Ser Asn Ile Pro Gly Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Asn	
		885 890 895
15	Tyr Ile Lys Asn Gln Leu Leu Gly Pro Asp Glu Asn Ala Lys Thr Tyr	
		900 905 910
	Ile Ala Ser Gln Gly Cys Leu Glu Ala Thr Val Asn Asp Phe Trp Gln	
		915 920 925
	Met Ala Trp Gln Glu Asn Ser Arg Val Ile Val Met Thr Thr Arg Glu	
20		930 935 940
	Val Glu Lys Gly Arg Asn Lys Cys Val Pro Tyr Trp Pro Glu Val Gly	
		945 950 955 960
	Met Gln Arg Ala Tyr Gly Pro Tyr Ser Val Thr Asn Cys Gly Glu His	
		965 970 975
25	Asp Thr Thr Glu Tyr Lys Leu Arg Thr Leu Gln Val Ser Pro Leu Asp	
		980 985 990
	Asn Gly Asp Leu Ile Arg Glu Ile Trp His Tyr Gln Tyr Leu Ser Trp	
		995 1000 1005
	Pro Asp His Gly Val Pro Ser Glu Pro Gly Gly Val Leu Ser Phe	
30		1010 1015 1020
	Leu Asp Gln Ile Asn Gln Arg Gln Glu Ser Leu Pro His Ala Gly	
		1025 1030 1035
	Pro Ile Ile Val His Cys Ser Ala Gly Ile Gly Arg Thr Gly Thr	
		1040 1045 1050
35	Ile Ile Val Ile Asp Met Leu Met Glu Asn Ile Ser Thr Lys Gly	
		1055 1060 1065
	Leu Asp Cys Asp Ile Asp Ile Gln Lys Thr Ile Gln Met Val Arg	
		1070 1075 1080
	Ala Gln Arg Ser Gly Met Val Gln Thr Glu Ala Gln Tyr Lys Phe	
40		1085 1090 1095
	Ile Tyr Val Ala Ile Ala Gln Phe Ile Glu Thr Thr Lys Lys Lys	
		1100 1105 1110
	Leu	
	<210> 5	
45	<211> 918	
	<212> Белок	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	

<223> Химерный антигенный рецептор (CAR)

<400> 5

```

Met Ser Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1          5          10          15
5  His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu
    20          25          30
    Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln
    35          40          45
10  Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr
    50          55          60
    Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
    65          70          75          80
    Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
    85          90          95
15  Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
    100          105          110
    Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr
    115          120          125
    Lys Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
20  130          135          140
    Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly
    145          150          155          160
    Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly
    165          170          175
25  Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg
    180          185          190
    Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr
    195          200          205
    Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser
30  210          215          220
    Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr
    225          230          235          240
    Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala
    245          250          255
35  Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Asp Pro
    260          265          270
    Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
    275          280          285
    Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
40  290          295          300
    Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Phe Trp
    305          310          315          320
    Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val
    325          330          335
45  Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Arg Val Lys Phe Ser Arg
    340          345          350
    Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
    355          360          365

```

RU 2717984 C2

	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	
	370							375				380					
	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	
	385					390					395					400	
5	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	
					405					410					415		
	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	
				420					425					430			
	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	
10				435				440					445				
	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	Arg	Ala	Glu	Gly	Arg	Gly	
	450						455					460					
	Ser	Leu	Leu	Thr	Cys	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Ala	
	465				470						475					480	
15	Val	Pro	Thr	Gln	Val	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Thr	Asp	Ala	
				485						490					495		
	Arg	Cys	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	
				500					505					510			
	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asp	Ile	Tyr	
20				515				520					525				
	Phe	Asn	Leu	Val	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	
	530						535					540					
	Leu	Ile	Tyr	Asp	Thr	Asn	Arg	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	
	545					550				555						560	
25	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	
				565					570						575		
	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Tyr	Lys	Asn	Tyr	
				580				585					590				
	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ser	Gly	
30				595				600					605				
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
	610					615					620						
	Gly	Gly	Ser	Arg	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	
	625					630					635					640	
35	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	
				645					650						655		
	Thr	Leu	Ser	Asn	Tyr	Gly	Met	His	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	
				660					665					670			
	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ser	Ile	Ser	Leu	Asn	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	
40				675				680					685				
	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	
	690					695						700					
	Lys	Ser	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	
	705					710					715					720	
45	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Gln	Asp	Ala	Tyr	Thr	Gly	Gly	Tyr	Phe	
				725					730					735			
	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Met	Asp	Pro	
				740					745					750			

RU 2717984 C2

Ala Thr Thr Thr Lys Pro Val Leu Arg Thr Pro Ser Pro Val His Pro
755 760 765
Thr Gly Thr Ser Gln Pro Gln Arg Pro Glu Asp Cys Arg Pro Arg Gly
770 775 780
5 Ser Val Lys Gly Thr Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Leu Ile Gly
785 790 795 800
Val Ser Val Val Phe Leu Phe Cys Leu Leu Leu Leu Val Leu Phe Cys
805 810 815
Leu His Arg Gln Asn Gln Ile Lys Gln Gly Pro Pro Arg Ser Lys Asp
10 820 825 830
Glu Glu Gln Lys Pro Gln Gln Arg Pro Asp Leu Ala Val Asp Val Leu
835 840 845
Glu Arg Thr Ala Asp Lys Ala Thr Val Asn Gly Leu Pro Glu Lys Asp
850 855 860
15 Arg Glu Thr Asp Thr Ser Ala Leu Ala Ala Gly Ser Ser Gln Glu Val
865 870 875 880
Thr Tyr Ala Gln Leu Asp His Trp Ala Leu Thr Gln Arg Thr Ala Arg
885 890 895
Ala Val Ser Pro Gln Ser Thr Lys Pro Met Ala Glu Ser Ile Thr Tyr
20 900 905 910
Ala Ala Val Ala Arg His
915
<210> 6
<211> 1363
25 <212> Белок
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Химерный антигенный рецептор (CAR)
<400> 6
30 Met Ser Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu
20 25 30
Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln
35 35 40 45
Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr
50 55 60
Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
65 70 75 80
40 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95
Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
100 105 110
Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr
45 115 120 125
Lys Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly

RU 2717984 C2

	145		150		155		160									
	Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly
					165					170					175	
	Val	Ser	Leu	Pro	Asp	Tyr	Gly	Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Arg
5				180						185					190	
	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Tyr
				195						200					205	
	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ile	Lys	Asp	Asn	Ser
				210						215					220	
10	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Thr	Asp	Asp	Thr
				225											230	
	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala
					245										250	
	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Asp	Pro
15				260											265	
	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala
					275										280	
	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly
				290											295	
20	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Phe	Trp
															305	
	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val
					325										330	
	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg
25				340											345	
	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn
					355										360	
	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg
				370											375	
30	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro
					385										390	
	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala
					405										410	
	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His
35				420											425	
	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp
					435										440	
	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	Arg	Ala	Glu	Gly	Arg	Gly
					450										455	
40	Ser	Leu	Leu	Thr	Cys	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Ala
					465										470	
	Val	Pro	Thr	Gln	Val	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Thr	Asp	Ala
					485										490	
	Arg	Cys	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser
45				500											505	
	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asp	Ile	Tyr
					515										520	
	Phe	Asn	Leu	Val	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu

RU 2717984 C2

	530		535		540												
	Leu	Ile	Tyr	Asp	Thr	Asn	Arg	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	
	545					550					555					560	
	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	
5						565					570					575	
	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Tyr	Lys	Asn	Tyr	
					580					585					590		
	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ser	Gly	
					595					600					605		
10	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
	610					615									620		
	Gly	Gly	Ser	Arg	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	
	625					630					635					640	
	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	
15					645						650					655	
	Thr	Leu	Ser	Asn	Tyr	Gly	Met	His	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	
					660						665					670	
	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ser	Ile	Ser	Leu	Asn	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	
					675						680					685	
20	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	
	690						695									700	
	Lys	Ser	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	
	705					710						715				720	
	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Gln	Asp	Ala	Tyr	Thr	Gly	Gly	Tyr	Phe	
25					725						730					735	
	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Met	Asp	Pro	
					740						745					750	
	Ala	Thr	Thr	Thr	Lys	Pro	Val	Leu	Arg	Thr	Pro	Ser	Pro	Val	His	Pro	
					755						760					765	
30	Thr	Gly	Thr	Ser	Gln	Pro	Gln	Arg	Pro	Glu	Asp	Cys	Arg	Pro	Arg	Gly	
	770						775									780	
	Ser	Val	Lys	Gly	Thr	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Leu	Ile	Gly	
	785					790						795				800	
	Val	Ser	Val	Val	Phe	Leu	Phe	Cys	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Phe	Cys	
35					805						810					815	
	Leu	His	Arg	Gln	Asn	Gln	Ile	Lys	Gln	Gly	Pro	Pro	Arg	Ser	Lys	Asp	
					820						825					830	
	Glu	Glu	Gln	Lys	Pro	Gln	Gln	Arg	Pro	Asp	Leu	Ala	Val	Asp	Val	Leu	
					835						840					845	
40	Glu	Arg	Thr	Ala	Asp	Lys	Ala	Thr	Val	Asn	Gly	Leu	Pro	Glu	Lys	Asp	
	850						855									860	
	Arg	Glu	Thr	Asp	Thr	Ser	Ala	Leu	Ala	Ala	Gly	Ser	Ser	Gln	Glu	Val	
	865						870					875				880	
	Thr	Tyr	Ala	Gln	Leu	Asp	His	Trp	Ala	Leu	Thr	Gln	Arg	Thr	Ala	Arg	
45					885							890				895	
	Ala	Val	Ser	Pro	Gln	Ser	Thr	Lys	Pro	Met	Ala	Glu	Ser	Ile	Thr	Tyr	
					900						905					910	
	Ala	Ala	Val	Ala	Arg	His	Arg	Ala	Glu	Gly	Arg	Gly	Ser	Leu	Leu	Thr	

RU 2717984 C2

	915		920		925	
	Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Trp Tyr His Gly His Met					
	930		935		940	
5	Ser Gly Gly Gln Ala Glu Thr Leu Leu Gln Ala Lys Gly Glu Pro Trp					
	945		950		955	960
	Thr Phe Leu Val Arg Glu Ser Leu Ser Gln Pro Gly Asp Phe Val Leu					
		965		970		975
	Ser Val Leu Ser Asp Gln Pro Lys Ala Gly Pro Gly Ser Pro Leu Arg					
		980		985		990
10	Val Thr His Ile Lys Val Met Cys Glu Gly Gly Arg Tyr Thr Val Gly					
		995		1000		1005
	Gly Leu Glu Thr Phe Asp Ser Leu Thr Asp Leu Val Glu His Phe					
	1010		1015		1020	
15	Lys Lys Thr Gly Ile Glu Glu Ala Ser Gly Ala Phe Val Tyr Leu					
	1025		1030		1035	
	Arg Gln Pro Tyr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Phe Glu Ala Tyr Phe					
	1040		1045		1050	
	Lys Lys Gln Gln Ala Asp Ser Asn Cys Gly Phe Ala Glu Glu Tyr					
	1055		1060		1065	
20	Glu Asp Leu Lys Leu Val Gly Ile Ser Gln Pro Lys Tyr Ala Ala					
	1070		1075		1080	
	Glu Leu Ala Glu Asn Arg Gly Lys Asn Arg Tyr Asn Asn Val Leu					
	1085		1090		1095	
	Pro Tyr Asp Ile Ser Arg Val Lys Leu Ser Val Gln Thr His Ser					
25	1100		1105		1110	
	Thr Asp Asp Tyr Ile Asn Ala Asn Tyr Met Pro Gly Tyr His Ser					
	1115		1120		1125	
	Lys Lys Asp Phe Ile Ala Thr Gln Gly Pro Leu Pro Asn Thr Leu					
	1130		1135		1140	
30	Lys Asp Phe Trp Arg Met Val Trp Glu Lys Asn Val Tyr Ala Ile					
	1145		1150		1155	
	Ile Met Leu Thr Lys Cys Val Glu Gln Gly Arg Thr Lys Cys Glu					
	1160		1165		1170	
	Glu Tyr Trp Pro Ser Lys Gln Ala Gln Asp Tyr Gly Asp Ile Thr					
35	1175		1180		1185	
	Val Ala Met Thr Ser Glu Ile Val Leu Pro Glu Trp Thr Ile Arg					
	1190		1195		1200	
	Asp Phe Thr Val Lys Asn Ile Gln Thr Ser Glu Ser His Pro Leu					
	1205		1210		1215	
40	Arg Gln Phe His Phe Thr Ser Trp Pro Asp His Gly Val Pro Asp					
	1220		1225		1230	
	Thr Thr Asp Leu Leu Ile Asn Phe Arg Tyr Leu Val Arg Asp Tyr					
	1235		1240		1245	
	Met Lys Gln Ser Pro Pro Glu Ser Pro Ile Leu Val His Cys Ser					
45	1250		1255		1260	
	Ala Gly Val Gly Arg Thr Gly Thr Phe Ile Ala Ile Asp Arg Leu					
	1265		1270		1275	
	Ile Tyr Gln Ile Glu Asn Glu Asn Thr Val Asp Val Tyr Gly Ile					

	1280		1285		1290
	Val Tyr Asp Leu Arg Met His	Arg Pro Leu Met Val	Gln Thr Glu		
	1295		1300		1305
	Asp Gln Tyr Val Phe Leu Asn	Gln Cys Val Leu Asp	Ile Val Arg		
5	1310		1315		1320
	Ser Gln Lys Asp Ser Lys Val	Asp Leu Ile Tyr Gln	Asn Thr Thr		
	1325		1330		1335
	Ala Met Thr Ile Tyr Glu Asn	Leu Ala Pro Val Thr	Thr Phe Gly		
	1340		1345		1350
10	Lys Thr Asn Gly Tyr Ile Ala	Ser Gly Ser			
	1355		1360		
	<210>	7			
	<211>	21			
	<212>	Белок			
15	<213>	Искусственная последовательность			
	<220>				
	<223>	Сигнальный пептид			
	<400>	7			
	Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met	Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala			
20	1	5	10	15	
	Asp His Ala Asp Gly				
		20			
	<210>	8			
	<211>	21			
25	<212>	Белок			
	<213>	Искусственная последовательность			
	<220>				
	<223>	Сигнальный пептид			
	<400>	8			
30	Met Ser Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro	Leu Ala Leu Leu Leu			
	1	5	10	15	
	His Ala Ala Arg Pro				
		20			
	<210>	9			
35	<211>	20			
	<212>	Белок			
	<213>	Искусственная последовательность			
	<220>				
	<223>	Сигнальный пептид			
40	<400>	9			
	Met Ala Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Trp	Leu Thr			
	1	5	10	15	
	Asp Ala Arg Cys				
		20			
45	<210>	10			
	<211>	234			
	<212>	Белок			
	<213>	Искусственная последовательность			

<220>

<223> Спейсер (шарнир-CH₂CH₃ из IgG1 человека)

<400> 10

Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10 15
 Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp
 225 230

<210> 11

<211> 46

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Спейсер (стебель CD8 человека)

<400> 11

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
 1 5 10 15
 Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
 20 25 30
 Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile
 35 40 45
 <210> 12
 <211> 20

<212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Спейсер (шарнир IgG1 человека)
 5 <400> 12
 Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10 15
 Lys Asp Pro Lys
 20
 10 <210> 13
 <211> 185
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 15 <223> Спейсер (эктодомен CD2)
 <400> 13
 Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Glu Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp
 1 5 10 15
 Ile Asn Leu Asp Ile Pro Ser Phe Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp
 20 20 25 30
 Ile Lys Trp Glu Lys Thr Ser Asp Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg
 35 40 45
 Lys Glu Lys Glu Thr Phe Lys Glu Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys
 50 55 60
 25 Asn Gly Thr Leu Lys Ile Lys His Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile
 65 70 75 80
 Tyr Lys Val Ser Ile Tyr Asp Thr Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys
 85 90 95
 Ile Phe Asp Leu Lys Ile Gln Glu Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser
 30 100 105 110
 Trp Thr Cys Ile Asn Thr Thr Leu Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr
 115 120 125
 Asp Pro Glu Leu Asn Leu Tyr Gln Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser
 130 135 140
 35 Gln Arg Val Ile Thr His Lys Trp Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe
 145 150 155 160
 Lys Cys Thr Ala Gly Asn Lys Val Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro
 165 170 175
 Val Ser Cys Pro Glu Lys Gly Leu Asp
 40 180 185
 <210> 14
 <211> 259
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 45 <220>
 <223> Спейсер (эктодомен CD34)
 <400> 14
 Ser Leu Asp Asn Asn Gly Thr Ala Thr Pro Glu Leu Pro Thr Gln Gly

RU 2717984 C2

	1		5		10		15										
	Thr	Phe	Ser	Asn	Val	Ser	Thr	Asn	Val	Ser	Tyr	Gln	Glu	Thr	Thr	Thr	
				20				25					30				
	Pro	Ser	Thr	Leu	Gly	Ser	Thr	Ser	Leu	His	Pro	Val	Ser	Gln	His	Gly	
5			35					40				45					
	Asn	Glu	Ala	Thr	Thr	Asn	Ile	Thr	Glu	Thr	Thr	Val	Lys	Phe	Thr	Ser	
		50				55					60						
	Thr	Ser	Val	Ile	Thr	Ser	Val	Tyr	Gly	Asn	Thr	Asn	Ser	Ser	Val	Gln	
	65					70				75					80		
10	Ser	Gln	Thr	Ser	Val	Ile	Ser	Thr	Val	Phe	Thr	Thr	Pro	Ala	Asn	Val	
				85					90					95			
	Ser	Thr	Pro	Glu	Thr	Thr	Leu	Lys	Pro	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Asn	Val	
			100					105					110				
	Ser	Asp	Leu	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Ser	Leu	Ala	Thr	Ser	Pro	Thr	Lys	
15			115					120				125					
	Pro	Tyr	Thr	Ser	Ser	Ser	Pro	Ile	Leu	Ser	Asp	Ile	Lys	Ala	Glu	Ile	
		130				135					140						
	Lys	Cys	Ser	Gly	Ile	Arg	Glu	Val	Lys	Leu	Thr	Gln	Gly	Ile	Cys	Leu	
	145				150				155						160		
20	Glu	Gln	Asn	Lys	Thr	Ser	Ser	Cys	Ala	Glu	Phe	Lys	Lys	Asp	Arg	Gly	
				165					170					175			
	Glu	Gly	Leu	Ala	Arg	Val	Leu	Cys	Gly	Glu	Glu	Gln	Ala	Asp	Ala	Asp	
			180					185					190				
	Ala	Gly	Ala	Gln	Val	Cys	Ser	Leu	Leu	Leu	Ala	Gln	Ser	Glu	Val	Arg	
25			195					200				205					
	Pro	Gln	Cys	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Ala	Asn	Arg	Thr	Glu	Ile	Ser	Ser	
		210				215					220						
	Lys	Leu	Gln	Leu	Met	Lys	Lys	His	Gln	Ser	Asp	Leu	Lys	Lys	Leu	Gly	
	225				230				235						240		
30	Ile	Leu	Asp	Phe	Thr	Glu	Gln	Asp	Val	Ala	Ser	His	Gln	Ser	Tyr	Ser	
				245					250					255			
	Gln	Lys	Thr														
	<210>	15															
	<211>	140															
35	<212>	Белок															
	<213>	Искусственная последовательность															
	<220>																
	<223>	Трансмембранный домен CD28 и эндодомены CD3 Z															
	<400>	15															
40	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	
	1			5				10					15				
	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Arg	Val	Lys	Phe	
		20						25					30				
	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	
45			35					40				45					
	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	
		50				55					60						
	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	

RU 2 717 984 C2

	65				70				75				80				
	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	
					85					90					95		
5	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	
				100					105					110			
	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	
			115					120					125				
	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg					
		130					135					140					
10	<210>	16															
	<211>	180															
	<212>	Белок															
	<213>	Искусственная последовательность															
	<220>																
15	<223>	Трансмембранный домен CD28 и эндодомены CD28 и CD3 дзета															
	<400>	16															
	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	
	1			5					10					15			
	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	
20			20					25					30				
	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	
		35					40					45					
	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	Pro	Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	
		50				55				60							
25	Ala	Tyr	Arg	Ser	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	
	65				70				75					80			
	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	
				85					90					95			
	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	
30			100						105					110			
	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	
		115						120					125				
	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	
		130					135					140					
35	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	
	145					150				155					160		
	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	
				165					170					175			
	Leu	Pro	Pro	Arg													
40			180														
	<210>	17															
	<211>	216															

RU 2 717 984 C2

5	1	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser
					20					25					30		
		Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly
				35					40					45			
		Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	Pro	Pro	Arg	Asp	Phe	Ala
10				50				55					60				
		Ala	Tyr	Arg	Ser	Arg	Asp	Gln	Arg	Leu	Pro	Pro	Asp	Ala	His	Lys	Pro
	65						70					75					80
		Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Phe	Arg	Thr	Pro	Ile	Gln	Glu	Glu	Gln	Ala	Asp
					85						90					95	
15		Ala	His	Ser	Thr	Leu	Ala	Lys	Ile	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala
					100					105					110		
		Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu
				115					120					125			
		Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly
20				130				135					140				
		Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu
	145						150					155					160
		Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser
					165						170					175	
25		Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly
					180					185					190		
		Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu
				195					200					205			
		His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg								
30				210				215									
	<210>	18															
	<211>	729															
	<212>	Белок															
	<213>	Искусственная последовательность															
35	<220>																
	<223>	Трансмембранный и эндодомен CD45															
	<400>	18															
		Ala	Leu	Ile	Ala	Phe	Leu	Ala	Phe	Leu	Ile	Ile	Val	Thr	Ser	Ile	Ala
	1				5					10						15	
40		Leu	Leu	Val	Val	Leu	Tyr	Lys	Ile	Tyr	Asp	Leu	His	Lys	Lys	Arg	Ser
					20					25					30		
		Cys	Asn	Leu	Asp	Glu	Gln	Gln	Glu	Leu	Val	Glu	Arg	Asp	Asp	Glu	Lys
				35					40					45			
		Gln	Leu	Met	Asn	Val	Glu	Pro	Ile	His	Ala	Asp	Ile	Leu	Leu	Glu	Thr
45				50				55					60				
		Tyr	Lys	Arg	Lys	Ile	Ala	Asp	Glu	Gly	Arg	Leu	Phe	Leu	Ala	Glu	Phe
	65						70					75					

RU 2717984 C2

	Asp	Tyr	Asn	Arg	Val	Glu	Leu	Ser	Glu	Ile	Asn	Gly	Asp	Ala	Gly	Ser	
						115					120				125		
	Asn	Tyr	Ile	Asn	Ala	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Phe	Lys	Glu	Pro	Arg	Lys	
						130					135				140		
5	Tyr	Ile	Ala	Ala	Gln	Gly	Pro	Arg	Asp	Glu	Thr	Val	Asp	Asp	Phe	Trp	
						145					150				155		160
	Arg	Met	Ile	Trp	Glu	Gln	Lys	Ala	Thr	Val	Ile	Val	Met	Val	Thr	Arg	
						165					170				175		
	Cys	Glu	Glu	Gly	Asn	Arg	Asn	Lys	Cys	Ala	Glu	Tyr	Trp	Pro	Ser	Met	
10						180					185				190		
	Glu	Glu	Gly	Thr	Arg	Ala	Phe	Gly	Asp	Val	Val	Val	Lys	Ile	Asn	Gln	
						195					200				205		
	His	Lys	Arg	Cys	Pro	Asp	Tyr	Ile	Ile	Gln	Lys	Leu	Asn	Ile	Val	Asn	
						210					215				220		
15	Lys	Lys	Glu	Lys	Ala	Thr	Gly	Arg	Glu	Val	Thr	His	Ile	Gln	Phe	Thr	
						225					230				235		240
	Ser	Trp	Pro	Asp	His	Gly	Val	Pro	Glu	Asp	Pro	His	Leu	Leu	Leu	Lys	
						245					250				255		
	Leu	Arg	Arg	Arg	Val	Asn	Ala	Phe	Ser	Asn	Phe	Phe	Ser	Gly	Pro	Ile	
20						260					265				270		
	Val	Val	His	Cys	Ser	Ala	Gly	Val	Gly	Arg	Thr	Gly	Thr	Tyr	Ile	Gly	
						275					280				285		
	Ile	Asp	Ala	Met	Leu	Glu	Gly	Leu	Glu	Ala	Glu	Asn	Lys	Val	Asp	Val	
						290					295				300		
25	Tyr	Gly	Tyr	Val	Val	Lys	Leu	Arg	Arg	Gln	Arg	Cys	Leu	Met	Val	Gln	
						305					310				315		320
	Val	Glu	Ala	Gln	Tyr	Ile	Leu	Ile	His	Gln	Ala	Leu	Val	Glu	Tyr	Asn	
						325					330				335		
	Gln	Phe	Gly	Glu	Thr	Glu	Val	Asn	Leu	Ser	Glu	Leu	His	Pro	Tyr	Leu	
30						340					345				350		
	His	Asn	Met	Lys	Lys	Arg	Asp	Pro	Pro	Ser	Glu	Pro	Ser	Pro	Leu	Glu	
						355					360				365		
	Ala	Glu	Phe	Gln	Arg	Leu	Pro	Ser	Tyr	Arg	Ser	Trp	Arg	Thr	Gln	His	
						370					375				380		
35	Ile	Gly	Asn	Gln	Glu	Glu	Asn	Lys	Ser	Lys	Asn	Arg	Asn	Ser	Asn	Val	
						385					390				395		400
	Ile	Pro	Tyr	Asp	Tyr	Asn	Arg	Val	Pro	Leu	Lys	His	Glu	Leu	Glu	Met	
						405					410				415		
	Ser	Lys	Glu	Ser	Glu	His	Asp	Ser	Asp	Glu	Ser	Ser	Asp	Asp	Asp	Ser	
40						420					425				430		
	Asp	Ser	Glu	Glu	Pro	Ser	Lys	Tyr	Ile	Asn	Ala	Ser	Phe	Ile	Met	Ser	
						435					440				445		
	Tyr	Trp	Lys	Pro	Glu	Val	Met	Ile	Ala	Ala	Gln	Gly	Pro	Leu	Lys	Glu	
						450					455				460		
45	Thr	Ile	Gly	Asp	Phe	Trp	Gln	Met	Ile	Phe	Gln	Arg	Lys	Val	Lys	Val	
						465					470				475		480
	Ile	Val	Met	Leu	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Gly	Asp	Gln	Glu	Ile	Cys	Ala	
						485					490				495		

RU 2717984 C2

Gln Tyr Trp Gly Glu Gly Lys Gln Thr Tyr Gly Asp Ile Glu Val Asp
500 505 510
Leu Lys Asp Thr Asp Lys Ser Ser Thr Tyr Thr Leu Arg Val Phe Glu
515 520 525
5 Leu Arg His Ser Lys Arg Lys Asp Ser Arg Thr Val Tyr Gln Tyr Gln
530 535 540
Tyr Thr Asn Trp Ser Val Glu Gln Leu Pro Ala Glu Pro Lys Glu Leu
545 550 555 560
Ile Ser Met Ile Gln Val Val Lys Gln Lys Leu Pro Gln Lys Asn Ser
10 565 570 575
Ser Glu Gly Asn Lys His His Lys Ser Thr Pro Leu Leu Ile His Cys
580 585 590
Arg Asp Gly Ser Gln Gln Thr Gly Ile Phe Cys Ala Leu Leu Asn Leu
595 600 605
15 Leu Glu Ser Ala Glu Thr Glu Glu Val Val Asp Ile Phe Gln Val Val
610 615 620
Lys Ala Leu Arg Lys Ala Arg Pro Gly Met Val Ser Thr Phe Glu Gln
625 630 635 640
Tyr Gln Phe Leu Tyr Asp Val Ile Ala Ser Thr Tyr Pro Ala Gln Asn
20 645 650 655
Gly Gln Val Lys Lys Asn Asn His Gln Glu Asp Lys Ile Glu Phe Asp
660 665 670
Asn Glu Val Asp Lys Val Lys Gln Asp Ala Asn Cys Val Asn Pro Leu
675 680 685
25 Gly Ala Pro Glu Lys Leu Pro Glu Ala Lys Glu Gln Ala Glu Gly Ser
690 695 700
Glu Pro Thr Ser Gly Thr Glu Gly Pro Glu His Ser Val Asn Gly Pro
705 710 715 720
Ala Ser Pro Ala Leu Asn Gln Gly Ser
30 725
<210> 19
<211> 362
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность
35 <220>
<223> Трансмембранный и эндодомен CD148
<400> 19
Ala Val Phe Gly Cys Ile Phe Gly Ala Leu Val Ile Val Thr Val Gly
1 5 10 15
40 Gly Phe Ile Phe Trp Arg Lys Lys Arg Lys Asp Ala Lys Asn Asn Glu
20 25 30
Val Ser Phe Ser Gln Ile Lys Pro Lys Lys Ser Lys Leu Ile Arg Val
35 40 45
Glu Asn Phe Glu Ala Tyr Phe Lys Lys Gln Gln Ala Asp Ser Asn Cys
45 50 55 60
Gly Phe Ala Glu Glu Tyr Glu Asp Leu Lys Leu Val Gly Ile Ser Gln
65 70 75 80
Pro Lys Tyr Ala Ala Glu Leu Ala Glu Asn Arg Gly Lys Asn Arg Tyr

RU 2717984 C2

				85					90				95			
	Asn	Asn	Val	Leu	Pro	Tyr	Asp	Ile	Ser	Arg	Val	Lys	Leu	Ser	Val	Gln
				100					105				110			
	Thr	His	Ser	Thr	Asp	Asp	Tyr	Ile	Asn	Ala	Asn	Tyr	Met	Pro	Gly	Tyr
5				115				120					125			
	His	Ser	Lys	Lys	Asp	Phe	Ile	Ala	Thr	Gln	Gly	Pro	Leu	Pro	Asn	Thr
				130				135				140				
	Leu	Lys	Asp	Phe	Trp	Arg	Met	Val	Trp	Glu	Lys	Asn	Val	Tyr	Ala	Ile
	145					150					155				160	
10	Ile	Met	Leu	Thr	Lys	Cys	Val	Glu	Gln	Gly	Arg	Thr	Lys	Cys	Glu	Glu
				165						170				175		
	Tyr	Trp	Pro	Ser	Lys	Gln	Ala	Gln	Asp	Tyr	Gly	Asp	Ile	Thr	Val	Ala
				180					185				190			
	Met	Thr	Ser	Glu	Ile	Val	Leu	Pro	Glu	Trp	Thr	Ile	Arg	Asp	Phe	Thr
15				195				200					205			
	Val	Lys	Asn	Ile	Gln	Thr	Ser	Glu	Ser	His	Pro	Leu	Arg	Gln	Phe	His
				210				215				220				
	Phe	Thr	Ser	Trp	Pro	Asp	His	Gly	Val	Pro	Asp	Thr	Thr	Asp	Leu	Leu
	225					230				235					240	
20	Ile	Asn	Phe	Arg	Tyr	Leu	Val	Arg	Asp	Tyr	Met	Lys	Gln	Ser	Pro	Pro
				245						250				255		
	Glu	Ser	Pro	Ile	Leu	Val	His	Cys	Ser	Ala	Gly	Val	Gly	Arg	Thr	Gly
				260					265				270			
	Thr	Phe	Ile	Ala	Ile	Asp	Arg	Leu	Ile	Tyr	Gln	Ile	Glu	Asn	Glu	Asn
25				275				280					285			
	Thr	Val	Asp	Val	Tyr	Gly	Ile	Val	Tyr	Asp	Leu	Arg	Met	His	Arg	Pro
				290				295				300				
	Leu	Met	Val	Gln	Thr	Glu	Asp	Gln	Tyr	Val	Phe	Leu	Asn	Gln	Cys	Val
	305					310				315					320	
30	Leu	Asp	Ile	Val	Arg	Ser	Gln	Lys	Asp	Ser	Lys	Val	Asp	Leu	Ile	Tyr
				325						330				335		
	Gln	Asn	Thr	Thr	Ala	Met	Thr	Ile	Tyr	Glu	Asn	Leu	Ala	Pro	Val	Thr
				340					345				350			
	Thr	Phe	Gly	Lys	Thr	Asn	Gly	Tyr	Ile	Ala						
35				355				360								
	<210>	20														
	<211>	595														
	<212>	Белок														
	<213>	Искусственная последовательность														
40	<220>															
	<223>	Последовательность PTPN6														
	<400>	20														
	Met	Val	Arg	Trp	Phe	His	Arg	Asp	Leu	Ser	Gly	Leu	Asp	Ala	Glu	Thr
	1			5					10					15		
45	Leu	Leu	Lys	Gly	Arg	Gly	Val	His	Gly	Ser	Phe	Leu	Ala	Arg	Pro	Ser
				20					25				30			
	Arg	Lys	Asn	Gln	Gly	Asp	Phe	Ser	Leu	Ser	Val	Arg	Val	Gly	Asp	Gln
				35				40				45				

RU 2717984 C2

	Val	Thr	His	Ile	Arg	Ile	Gln	Asn	Ser	Gly	Asp	Phe	Tyr	Asp	Leu	Tyr
	50						55					60				
	Gly	Gly	Glu	Lys	Phe	Ala	Thr	Leu	Thr	Glu	Leu	Val	Glu	Tyr	Tyr	Thr
	65					70				75						80
5	Gln	Gln	Gln	Gly	Val	Leu	Gln	Asp	Arg	Asp	Gly	Thr	Ile	Ile	His	Leu
				85						90					95	
	Lys	Tyr	Pro	Leu	Asn	Cys	Ser	Asp	Pro	Thr	Ser	Glu	Arg	Trp	Tyr	His
				100					105					110		
	Gly	His	Met	Ser	Gly	Gly	Gln	Ala	Glu	Thr	Leu	Leu	Gln	Ala	Lys	Gly
10			115					120					125			
	Glu	Pro	Trp	Thr	Phe	Leu	Val	Arg	Glu	Ser	Leu	Ser	Gln	Pro	Gly	Asp
	130						135				140					
	Phe	Val	Leu	Ser	Val	Leu	Ser	Asp	Gln	Pro	Lys	Ala	Gly	Pro	Gly	Ser
	145					150					155					160
15	Pro	Leu	Arg	Val	Thr	His	Ile	Lys	Val	Met	Cys	Glu	Gly	Gly	Arg	Tyr
				165						170					175	
	Thr	Val	Gly	Gly	Leu	Glu	Thr	Phe	Asp	Ser	Leu	Thr	Asp	Leu	Val	Glu
			180						185					190		
	His	Phe	Lys	Lys	Thr	Gly	Ile	Glu	Glu	Ala	Ser	Gly	Ala	Phe	Val	Tyr
20			195					200				205				
	Leu	Arg	Gln	Pro	Tyr	Tyr	Ala	Thr	Arg	Val	Asn	Ala	Ala	Asp	Ile	Glu
	210						215					220				
	Asn	Arg	Val	Leu	Glu	Leu	Asn	Lys	Lys	Gln	Glu	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala
	225					230					235					240
25	Lys	Ala	Gly	Phe	Trp	Glu	Glu	Phe	Glu	Ser	Leu	Gln	Lys	Gln	Glu	Val
				245						250					255	
	Lys	Asn	Leu	His	Gln	Arg	Leu	Glu	Gly	Gln	Arg	Pro	Glu	Asn	Lys	Gly
			260						265					270		
	Lys	Asn	Arg	Tyr	Lys	Asn	Ile	Leu	Pro	Phe	Asp	His	Ser	Arg	Val	Ile
30			275					280					285			
	Leu	Gln	Gly	Arg	Asp	Ser	Asn	Ile	Pro	Gly	Ser	Asp	Tyr	Ile	Asn	Ala
	290						295					300				
	Asn	Tyr	Ile	Lys	Asn	Gln	Leu	Leu	Gly	Pro	Asp	Glu	Asn	Ala	Lys	Thr
	305					310					315					320
35	Tyr	Ile	Ala	Ser	Gln	Gly	Cys	Leu	Glu	Ala	Thr	Val	Asn	Asp	Phe	Trp
				325						330					335	
	Gln	Met	Ala	Trp	Gln	Glu	Asn	Ser	Arg	Val	Ile	Val	Met	Thr	Thr	Arg
			340						345					350		
	Glu	Val	Glu	Lys	Gly	Arg	Asn	Lys	Cys	Val	Pro	Tyr	Trp	Pro	Glu	Val
40			355					360					365			
	Gly	Met	Gln	Arg	Ala	Tyr	Gly	Pro	Tyr	Ser	Val	Thr	Asn	Cys	Gly	Glu
	370						375					380				
	His	Asp	Thr	Thr	Glu	Tyr	Lys	Leu	Arg	Thr	Leu	Gln	Val	Ser	Pro	Leu
	385					390					395					400
45	Asp	Asn	Gly	Asp	Leu	Ile	Arg	Glu	Ile	Trp	His	Tyr	Gln	Tyr	Leu	Ser
				405						410					415	
	Trp	Pro	Asp	His	Gly	Val	Pro	Ser	Glu	Pro	Gly	Gly	Val	Leu	Ser	Phe
			420						425					430		

RU 2717984 C2

Leu Asp Gln Ile Asn Gln Arg Gln Glu Ser Leu Pro His Ala Gly Pro
 435 440 445
 Ile Ile Val His Cys Ser Ala Gly Ile Gly Arg Thr Gly Thr Ile Ile
 450 455 460
 5 Val Ile Asp Met Leu Met Glu Asn Ile Ser Thr Lys Gly Leu Asp Cys
 465 470 475 480
 Asp Ile Asp Ile Gln Lys Thr Ile Gln Met Val Arg Ala Gln Arg Ser
 485 490 495
 Gly Met Val Gln Thr Glu Ala Gln Tyr Lys Phe Ile Tyr Val Ala Ile
 10 500 505 510
 Ala Gln Phe Ile Glu Thr Thr Lys Lys Lys Leu Glu Val Leu Gln Ser
 515 520 525
 Gln Lys Gly Gln Glu Ser Glu Tyr Gly Asn Ile Thr Tyr Pro Pro Ala
 530 535 540
 15 Met Lys Asn Ala His Ala Lys Ala Ser Arg Thr Ser Ser Lys His Lys
 545 550 555 560
 Glu Asp Val Tyr Glu Asn Leu His Thr Lys Asn Lys Arg Glu Glu Lys
 565 570 575
 Val Lys Lys Gln Arg Ser Ala Asp Lys Glu Lys Ser Lys Gly Ser Leu
 20 580 585 590
 Lys Arg Lys
 595
 <210> 21
 <211> 272
 25 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Последовательность фосфатазного домена из PTPN6
 <400> 21
 30 Phe Trp Glu Glu Phe Glu Ser Leu Gln Lys Gln Glu Val Lys Asn Leu
 1 5 10 15
 His Gln Arg Leu Glu Gly Gln Arg Pro Glu Asn Lys Gly Lys Asn Arg
 20 25 30
 Tyr Lys Asn Ile Leu Pro Phe Asp His Ser Arg Val Ile Leu Gln Gly
 35 35 40 45
 Arg Asp Ser Asn Ile Pro Gly Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Asn Tyr Ile
 50 55 60
 Lys Asn Gln Leu Leu Gly Pro Asp Glu Asn Ala Lys Thr Tyr Ile Ala
 65 70 75 80
 40 Ser Gln Gly Cys Leu Glu Ala Thr Val Asn Asp Phe Trp Gln Met Ala
 85 90 95
 Trp Gln Glu Asn Ser Arg Val Ile Val Met Thr Thr Arg Glu Val Glu
 100 105 110
 Lys Gly Arg Asn Lys Cys Val Pro Tyr Trp Pro Glu Val Gly Met Gln
 45 115 120 125
 Arg Ala Tyr Gly Pro Tyr Ser Val Thr Asn Cys Gly Glu His Asp Thr
 130 135 140
 Thr Glu Tyr Lys Leu Arg Thr Leu Gln Val Ser Pro Leu Asp Asn Gly

RU 2717984 C2

	145		150		155		160									
	Asp	Leu	Ile	Arg	Glu	Ile	Trp	His	Tyr	Gln	Tyr	Leu	Ser	Trp	Pro	Asp
				165					170						175	
	His	Gly	Val	Pro	Ser	Glu	Pro	Gly	Gly	Val	Leu	Ser	Phe	Leu	Asp	Gln
5				180					185						190	
	Ile	Asn	Gln	Arg	Gln	Glu	Ser	Leu	Pro	His	Ala	Gly	Pro	Ile	Ile	Val
			195					200					205			
	His	Cys	Ser	Ala	Gly	Ile	Gly	Arg	Thr	Gly	Thr	Ile	Ile	Val	Ile	Asp
		210					215					220				
10	Met	Leu	Met	Glu	Asn	Ile	Ser	Thr	Lys	Gly	Leu	Asp	Cys	Asp	Ile	Asp
	225				230					235				240		
	Ile	Gln	Lys	Thr	Ile	Gln	Met	Val	Arg	Ala	Gln	Arg	Ser	Gly	Met	Val
				245					250					255		
	Gln	Thr	Glu	Ala	Gln	Tyr	Lys	Phe	Ile	Tyr	Val	Ala	Ile	Ala	Gln	Phe
15			260					265					270			
	<210>	22														
	<211>	97														
	<212>	Белок														
	<213>	Искусственная последовательность														
20	<220>															
	<223>	Эндодомен PDCD1														
	<400>	22														
	Cys	Ser	Arg	Ala	Ala	Arg	Gly	Thr	Ile	Gly	Ala	Arg	Arg	Thr	Gly	Gln
	1			5					10					15		
25	Pro	Leu	Lys	Glu	Asp	Pro	Ser	Ala	Val	Pro	Val	Phe	Ser	Val	Asp	Tyr
			20					25					30			
	Gly	Glu	Leu	Asp	Phe	Gln	Trp	Arg	Glu	Lys	Thr	Pro	Glu	Pro	Pro	Val
		35				40					45					
	Pro	Cys	Val	Pro	Glu	Gln	Thr	Glu	Tyr	Ala	Thr	Ile	Val	Phe	Pro	Ser
30		50				55					60					
	Gly	Met	Gly	Thr	Ser	Ser	Pro	Ala	Arg	Arg	Gly	Ser	Ala	Asp	Gly	Pro
	65			70					75					80		
	Arg	Ser	Ala	Gln	Pro	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Gly	His	Cys	Ser	Trp	Pro
			85					90					95			
35	Leu															
	<210>	23														
	<211>	141														
	<212>	Белок														
	<213>	Искусственная последовательность														
40	<220>															
	<223>	Эндодомен BTLA4														
	<400>	23														
	Lys	Leu	Gln	Arg	Arg	Trp	Lys	Arg	Thr	Gln	Ser	Gln	Gln	Gly	Leu	Gln
	1		5						10					15		
45	Glu	Asn	Ser	Ser	Gly	Gln	Ser	Phe	Phe	Val	Arg	Asn	Lys	Lys	Val	Arg
		20						25					30			
	Arg	Ala	Pro	Leu	Ser	Glu	Gly	Pro	His	Ser	Leu	Gly	Cys	Tyr	Asn	Pro
		35					40					45				

RU 2717984 C2

Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Thr Thr Leu Arg Phe Pro Glu Met
50 55 60
Asn Ile Pro Arg Thr Gly Asp Ala Glu Ser Ser Glu Met Gln Arg Pro
65 70 75 80
5 Pro Pro Asp Cys Asp Asp Thr Val Thr Tyr Ser Ala Leu His Lys Arg
85 90 95
Gln Val Gly Asp Tyr Glu Asn Val Ile Pro Asp Phe Pro Glu Asp Glu
100 105 110
Gly Ile His Tyr Ser Glu Leu Ile Gln Phe Gly Val Gly Glu Arg Pro
10 115 120 125
Gln Ala Gln Glu Asn Val Asp Tyr Val Ile Leu Lys His
130 135 140
<210> 24
<211> 168
15 <212> Белок
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Эндодомен LILRB1
<400> 24
20 Leu Arg His Arg Arg Gln Gly Lys His Trp Thr Ser Thr Gln Arg Lys
1 5 10 15
Ala Asp Phe Gln His Pro Ala Gly Ala Val Gly Pro Glu Pro Thr Asp
20 25 30
Arg Gly Leu Gln Trp Arg Ser Ser Pro Ala Ala Asp Ala Gln Glu Glu
25 35 40 45
Asn Leu Tyr Ala Ala Val Lys His Thr Gln Pro Glu Asp Gly Val Glu
50 55 60
Met Asp Thr Arg Ser Pro His Asp Glu Asp Pro Gln Ala Val Thr Tyr
65 70 75 80
30 Ala Glu Val Lys His Ser Arg Pro Arg Arg Glu Met Ala Ser Pro Pro
85 90 95
Ser Pro Leu Ser Gly Glu Phe Leu Asp Thr Lys Asp Arg Gln Ala Glu
100 105 110
Glu Asp Arg Gln Met Asp Thr Glu Ala Ala Ala Ser Glu Ala Pro Gln
35 115 120 125
Asp Val Thr Tyr Ala Gln Leu His Ser Leu Thr Leu Arg Arg Glu Ala
130 135 140
Thr Glu Pro Pro Pro Ser Gln Glu Gly Pro Ser Pro Ala Val Pro Ser
145 150 155 160
40 Ile Tyr Ala Thr Leu Ala Ile His
165
<210> 25
<211> 101
<212> Белок
45 <213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Эндодомен LAIR1
<400> 25

RU 2717984 C2

His Arg Gln Asn Gln Ile Lys Gln Gly Pro Pro Arg Ser Lys Asp Glu
 1 5 10 15
 Glu Gln Lys Pro Gln Gln Arg Pro Asp Leu Ala Val Asp Val Leu Glu
 20 25 30
 5 Arg Thr Ala Asp Lys Ala Thr Val Asn Gly Leu Pro Glu Lys Asp Arg
 35 40 45
 Glu Thr Asp Thr Ser Ala Leu Ala Ala Gly Ser Ser Gln Glu Val Thr
 50 55 60
 Tyr Ala Gln Leu Asp His Trp Ala Leu Thr Gln Arg Thr Ala Arg Ala
 10 65 70 75 80
 Val Ser Pro Gln Ser Thr Lys Pro Met Ala Glu Ser Ile Thr Tyr Ala
 85 90 95
 Ala Val Ala Arg His
 100
 15 <210> 26
 <211> 62
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 20 <223> Эндодомен CTLA4
 <400> 26
 Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe Tyr
 1 5 10 15
 Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys Arg
 25 20 25 30
 Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu Pro
 35 40 45
 Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn
 50 55 60
 30 <210> 27
 <211> 111
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 35 <223> Эндодомен KIR2DL1
 <400> 27
 Gly Asn Ser Arg His Leu His Val Leu Ile Gly Thr Ser Val Val Ile
 1 5 10 15
 Ile Pro Phe Ala Ile Leu Leu Phe Phe Leu Leu His Arg Trp Cys Ala
 40 20 25 30
 Asn Lys Lys Asn Ala Val Val Met Asp Gln Glu Pro Ala Gly Asn Arg
 35 40 45
 Thr Val Asn Arg Glu Asp Ser Asp Glu Gln Asp Pro Gln Glu Val Thr
 50 55 60
 45 Tyr Thr Gln Leu Asn His Cys Val Phe Thr Gln Arg Lys Ile Thr Arg
 65 70 75 80
 Pro Ser Gln Arg Pro Lys Thr Pro Pro Thr Asp Ile Ile Val Tyr Thr
 85 90 95

Glu Leu Pro Asn Ala Glu Ser Arg Ser Lys Val Val Ser Cys Pro
100 105 110

<210> 28
<211> 143
5 <212> Белок
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Эндодомен KIR2DL4
<400> 28

10 Gly Ile Ala Arg His Leu His Ala Val Ile Arg Tyr Ser Val Ala Ile
1 5 10 15
Ile Leu Phe Thr Ile Leu Pro Phe Phe Leu Leu His Arg Trp Cys Ser
20 25 30
Lys Lys Lys Glu Asn Ala Ala Val Met Asn Gln Glu Pro Ala Gly His
15 35 40 45
Arg Thr Val Asn Arg Glu Asp Ser Asp Glu Gln Asp Pro Gln Glu Val
50 55 60
Thr Tyr Ala Gln Leu Asp His Cys Ile Phe Thr Gln Arg Lys Ile Thr
65 70 75 80
20 Gly Pro Ser Gln Arg Ser Lys Arg Pro Ser Thr Asp Thr Ser Val Cys
85 90 95
Ile Glu Leu Pro Asn Ala Glu Pro Arg Ala Leu Ser Pro Ala His Glu
100 105 110
His His Ser Gln Ala Leu Met Gly Ser Ser Arg Glu Thr Thr Ala Leu
25 115 120 125
Ser Gln Thr Gln Leu Ala Ser Ser Asn Val Pro Ala Ala Gly Ile
130 135 140

<210> 29
<211> 143
30 <212> Белок
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Эндодомен KIR2DL5
<400> 29

35 Thr Gly Ile Arg Arg His Leu His Ile Leu Ile Gly Thr Ser Val Ala
1 5 10 15
Ile Ile Leu Phe Ile Ile Leu Phe Phe Phe Leu Leu His Cys Cys Cys
20 25 30
Ser Asn Lys Lys Asn Ala Ala Val Met Asp Gln Glu Pro Ala Gly Asp
40 35 40 45
Arg Thr Val Asn Arg Glu Asp Ser Asp Asp Gln Asp Pro Gln Glu Val
50 55 60
Thr Tyr Ala Gln Leu Asp His Cys Val Phe Thr Gln Thr Lys Ile Thr
65 70 75 80
45 Ser Pro Ser Gln Arg Pro Lys Thr Pro Pro Thr Asp Thr Thr Met Tyr
85 90 95
Met Glu Leu Pro Asn Ala Lys Pro Arg Ser Leu Ser Pro Ala His Lys
100 105 110

His His Ser Gln Ala Leu Arg Gly Ser Ser Arg Glu Thr Thr Ala Leu
115 120 125
Ser Gln Asn Arg Val Ala Ser Ser His Val Pro Ala Ala Gly Ile
130 135 140

5 <210> 30
<211> 111
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность
<220>

10 <223> Эндодомен KIR3DL1
<400> 30
Lys Asp Pro Arg His Leu His Ile Leu Ile Gly Thr Ser Val Val Ile
1 5 10 15
Ile Leu Phe Ile Leu Leu Leu Phe Phe Leu Leu His Leu Trp Cys Ser
15 20 25 30
Asn Lys Lys Asn Ala Ala Val Met Asp Gln Glu Pro Ala Gly Asn Arg
35 40 45
Thr Ala Asn Ser Glu Asp Ser Asp Glu Gln Asp Pro Glu Glu Val Thr
50 55 60
20 Tyr Ala Gln Leu Asp His Cys Val Phe Thr Gln Arg Lys Ile Thr Arg
65 70 75 80
Pro Ser Gln Arg Pro Lys Thr Pro Pro Thr Asp Thr Ile Leu Tyr Thr
85 90 95
Glu Leu Pro Asn Ala Lys Pro Arg Ser Lys Val Val Ser Cys Pro
25 100 105 110
<210> 31
<211> 97
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность
<220>

30 <223> Эндодомен KIR3DL3
<400> 31
Lys Asp Pro Gly Asn Ser Arg His Leu His Val Leu Ile Gly Thr Ser
1 5 10 15
35 Val Val Ile Ile Pro Phe Ala Ile Leu Leu Phe Phe Leu Leu His Arg
20 25 30
Trp Cys Ala Asn Lys Lys Asn Ala Val Val Met Asp Gln Glu Pro Ala
35 40 45
Gly Asn Arg Thr Val Asn Arg Glu Asp Ser Asp Glu Gln Asp Pro Gln
40 50 55 60
Glu Val Thr Tyr Ala Gln Leu Asn His Cys Val Phe Thr Gln Arg Lys
65 70 75 80
Ile Thr Arg Pro Ser Gln Arg Pro Lys Thr Pro Pro Thr Asp Thr Ser
85 90 95

45 Val
<210> 32
<211> 807
<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитный белок PTPN6-CD45

<400> 32

5	Trp	Tyr	His	Gly	His	Met	Ser	Gly	Gly	Gln	Ala	Glu	Thr	Leu	Leu	Gln
	1				5					10					15	
	Ala	Lys	Gly	Glu	Pro	Trp	Thr	Phe	Leu	Val	Arg	Glu	Ser	Leu	Ser	Gln
				20					25					30		
	Pro	Gly	Asp	Phe	Val	Leu	Ser	Val	Leu	Ser	Asp	Gln	Pro	Lys	Ala	Gly
10			35					40				45				
	Pro	Gly	Ser	Pro	Leu	Arg	Val	Thr	His	Ile	Lys	Val	Met	Cys	Glu	Gly
		50					55					60				
	Gly	Arg	Tyr	Thr	Val	Gly	Gly	Leu	Glu	Thr	Phe	Asp	Ser	Leu	Thr	Asp
	65				70					75					80	
15	Leu	Val	Glu	His	Phe	Lys	Lys	Thr	Gly	Ile	Glu	Glu	Ala	Ser	Gly	Ala
				85					90					95		
	Phe	Val	Tyr	Leu	Arg	Gln	Pro	Tyr	Lys	Ile	Tyr	Asp	Leu	His	Lys	Lys
				100				105						110		
	Arg	Ser	Cys	Asn	Leu	Asp	Glu	Gln	Gln	Glu	Leu	Val	Glu	Arg	Asp	Asp
20			115					120					125			
	Glu	Lys	Gln	Leu	Met	Asn	Val	Glu	Pro	Ile	His	Ala	Asp	Ile	Leu	Leu
		130					135					140				
	Glu	Thr	Tyr	Lys	Arg	Lys	Ile	Ala	Asp	Glu	Gly	Arg	Leu	Phe	Leu	Ala
	145				150				155						160	
25	Glu	Phe	Gln	Ser	Ile	Pro	Arg	Val	Phe	Ser	Lys	Phe	Pro	Ile	Lys	Glu
				165					170					175		
	Ala	Arg	Lys	Pro	Phe	Asn	Gln	Asn	Lys	Asn	Arg	Tyr	Val	Asp	Ile	Leu
				180				185					190			
	Pro	Tyr	Asp	Tyr	Asn	Arg	Val	Glu	Leu	Ser	Glu	Ile	Asn	Gly	Asp	Ala
30			195					200					205			
	Gly	Ser	Asn	Tyr	Ile	Asn	Ala	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Phe	Lys	Glu	Pro
		210					215					220				
	Arg	Lys	Tyr	Ile	Ala	Ala	Gln	Gly	Pro	Arg	Asp	Glu	Thr	Val	Asp	Asp
	225				230					235					240	
35	Phe	Trp	Arg	Met	Ile	Trp	Glu	Gln	Lys	Ala	Thr	Val	Ile	Val	Met	Val
				245					250						255	
	Thr	Arg	Cys	Glu	Glu	Gly	Asn	Arg	Asn	Lys	Cys	Ala	Glu	Tyr	Trp	Pro
			260					265					270			
	Ser	Met	Glu	Glu	Gly	Thr	Arg	Ala	Phe	Gly	Asp	Val	Val	Val	Lys	Ile
40			275					280					285			
	Asn	Gln	His	Lys	Arg	Cys	Pro	Asp	Tyr	Ile	Ile	Gln	Lys	Leu	Asn	Ile
		290					295					300				
	Val	Asn	Lys	Lys	Glu	Lys	Ala	Thr	Gly	Arg	Glu	Val	Thr	His	Ile	Gln
	305				310					315					320	
45	Phe	Thr	Ser	Trp	Pro	Asp	His	Gly	Val	Pro	Glu	Asp	Pro	His	Leu	Leu
				325					330					335		
	Leu	Lys	Leu	Arg	Arg	Arg	Val	Asn	Ala	Phe	Ser	Asn	Phe	Phe	Ser	Gly
				340				345						350		

RU 2717984 C2

	Pro	Ile	Val	Val	His	Cys	Ser	Ala	Gly	Val	Gly	Arg	Thr	Gly	Thr	Tyr	
																	355 360 365
	Ile	Gly	Ile	Asp	Ala	Met	Leu	Glu	Gly	Leu	Glu	Ala	Glu	Asn	Lys	Val	
																	370 375 380
5	Asp	Val	Tyr	Gly	Tyr	Val	Val	Lys	Leu	Arg	Arg	Gln	Arg	Cys	Leu	Met	
																	385 390 395 400
	Val	Gln	Val	Glu	Ala	Gln	Tyr	Ile	Leu	Ile	His	Gln	Ala	Leu	Val	Glu	
																	405 410 415
	Tyr	Asn	Gln	Phe	Gly	Glu	Thr	Glu	Val	Asn	Leu	Ser	Glu	Leu	His	Pro	
10																	420 425 430
	Tyr	Leu	His	Asn	Met	Lys	Lys	Arg	Asp	Pro	Pro	Ser	Glu	Pro	Ser	Pro	
																	435 440 445
	Leu	Glu	Ala	Glu	Phe	Gln	Arg	Leu	Pro	Ser	Tyr	Arg	Ser	Trp	Arg	Thr	
																	450 455 460
15	Gln	His	Ile	Gly	Asn	Gln	Glu	Glu	Asn	Lys	Ser	Lys	Asn	Arg	Asn	Ser	
																	465 470 475 480
	Asn	Val	Ile	Pro	Tyr	Asp	Tyr	Asn	Arg	Val	Leu	Lys	His	Glu	Leu	Glu	
																	485 490 495
	Met	Ser	Lys	Glu	Ser	Glu	His	Asp	Ser	Asp	Glu	Ser	Ser	Asp	Asp	Asp	
20																	500 505 510
	Ser	Asp	Ser	Glu	Glu	Pro	Ser	Lys	Tyr	Ile	Asn	Ala	Ser	Phe	Ile	Met	
																	515 520 525
	Ser	Tyr	Trp	Lys	Pro	Glu	Val	Met	Ile	Ala	Ala	Gln	Gly	Pro	Leu	Lys	
																	530 535 540
25	Glu	Thr	Ile	Gly	Asp	Phe	Met	Ile	Gln	Arg	Lys	Val	Lys	Val	Ile	Val	
																	545 550 555 560
	Met	Leu	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Gly	Asp	Gln	Glu	Ile	Cys	Ala	Gln	Tyr	
																	565 570 575
	Trp	Gly	Glu	Gly	Lys	Gln	Thr	Tyr	Gly	Asp	Ile	Glu	Val	Asp	Leu	Lys	
30																	580 585 590
	Asp	Thr	Asp	Lys	Ser	Ser	Thr	Tyr	Thr	Leu	Arg	Val	Phe	Glu	Leu	Arg	
																	595 600 605
	His	Ser	Lys	Arg	Lys	Asp	Ser	Arg	Thr	Val	Tyr	Gln	Tyr	Gln	Tyr	Thr	
																	610 615 620
35	Asn	Trp	Ser	Val	Glu	Gln	Leu	Pro	Ala	Glu	Pro	Lys	Glu	Leu	Ile	Ser	
																	625 630 635 640
	Met	Ile	Gln	Val	Val	Lys	Gln	Lys	Leu	Pro	Gln	Lys	Asn	Ser	Ser	Glu	
																	645 650 655
	Gly	Asn	Lys	His	His	Lys	Ser	Thr	Pro	Leu	Leu	Ile	His	Cys	Arg	Asp	
40																	660 665 670
	Gly	Ser	Gln	Gln	Thr	Gly	Ile	Phe	Cys	Ala	Leu	Leu	Asn	Leu	Leu	Glu	
																	675 680 685
	Ser	Ala	Glu	Thr	Glu	Glu	Val	Val	Asp	Ile	Phe	Gln	Val	Val	Lys	Ala	
																	690 695 700
45	Leu	Arg	Lys	Ala	Arg	Pro	Gly	Met	Val	Ser	Thr	Phe	Glu	Gln	Tyr	Gln	
																	705 710 715 720
	Phe	Leu	Tyr	Asp	Val	Ile	Ala	Ser	Thr	Tyr	Pro	Ala	Gln	Asn	Gly	Gln	
																	725 730 735

Val Lys Lys Asn Asn His Gln Glu Asp Lys Ile Glu Phe Asp Asn Glu
740 745 750
Val Asp Lys Val Lys Gln Asp Ala Asn Cys Val Asn Pro Leu Gly Ala
755 760 765
5 Pro Glu Lys Leu Pro Glu Ala Lys Glu Gln Ala Glu Gly Ser Glu Pro
770 775 780
Thr Ser Gly Thr Glu Gly Pro Glu His Ser Val Asn Gly Pro Ala Ser
785 790 795 800
Pro Ala Leu Asn Gln Gly Ser
10 805
<210> 33
<211> 434
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность
15 <220>
<223> Слитный белок PTPN6-CD148
<400> 33
Glu Thr Leu Leu Gln Ala Lys Gly Glu Pro Trp Thr Phe Leu Val Arg
1 5 10 15
20 Glu Ser Leu Ser Gln Pro Gly Asp Phe Val Leu Ser Val Leu Ser Asp
20 25 30
Gln Pro Lys Ala Gly Pro Gly Ser Pro Leu Arg Val Thr His Ile Lys
35 40 45
Val Met Cys Glu Gly Gly Arg Tyr Thr Val Gly Gly Leu Glu Thr Phe
25 50 55 60
Asp Ser Leu Thr Asp Leu Val Glu His Phe Lys Lys Thr Gly Ile Glu
65 70 75 80
Glu Ala Ser Gly Ala Phe Val Tyr Leu Arg Gln Pro Tyr Arg Lys Lys
85 90 95
30 Arg Lys Asp Ala Lys Asn Asn Glu Val Ser Phe Ser Gln Ile Lys Pro
100 105 110
Lys Lys Ser Lys Leu Ile Arg Val Glu Asn Phe Glu Ala Tyr Phe Lys
115 120 125
Lys Gln Gln Ala Asp Ser Asn Cys Gly Phe Ala Glu Glu Tyr Glu Asp
35 130 135 140
Leu Lys Leu Val Gly Ile Ser Gln Pro Lys Tyr Ala Ala Glu Leu Ala
145 150 155 160
Glu Asn Arg Gly Lys Asn Arg Tyr Asn Asn Val Leu Pro Tyr Asp Ile
165 170 175
40 Ser Arg Val Lys Leu Ser Val Gln Thr His Ser Thr Asp Asp Tyr Ile
180 185 190
Asn Ala Asn Tyr Met Pro Gly Tyr His Ser Lys Lys Asp Phe Ile Ala
195 200 205
Thr Gln Gly Pro Leu Pro Asn Thr Leu Lys Asp Phe Trp Arg Met Val
45 210 215 220
Trp Glu Lys Asn Val Tyr Ala Ile Ile Met Leu Thr Lys Cys Val Glu
225 230 235 240
Gln Gly Arg Thr Lys Cys Glu Glu Tyr Trp Pro Ser Lys Gln Ala Gln

		245		250		255	
		Asp Tyr Gly Asp Ile Thr Val Ala Met Thr Ser Glu Ile Val Leu Pro					
		260		265		270	
		Glu Trp Thr Ile Arg Asp Phe Thr Val Lys Asn Ile Gln Thr Ser Glu					
5		275		280		285	
		Ser His Pro Leu Arg Gln Phe His Phe Thr Ser Trp Pro Asp His Gly					
		290		295		300	
		Val Pro Asp Thr Thr Asp Leu Leu Ile Asn Phe Arg Tyr Leu Val Arg					
		305		310		315	
10		Asp Tyr Met Lys Gln Ser Pro Pro Glu Ser Pro Ile Leu Val His Cys					
		325		330		335	
		Ser Ala Gly Val Gly Arg Thr Gly Thr Phe Ile Ala Ile Asp Arg Leu					
		340		345		350	
		Ile Tyr Gln Ile Glu Asn Glu Asn Thr Val Asp Val Tyr Gly Ile Val					
15		355		360		365	
		Tyr Asp Leu Arg Met His Arg Pro Leu Met Val Gln Thr Glu Asp Gln					
		370		375		380	
		Tyr Val Phe Leu Asn Gln Cys Val Leu Asp Ile Val Arg Ser Gln Lys					
		385		390		395	
20		Asp Ser Lys Val Asp Leu Ile Tyr Gln Asn Thr Thr Ala Met Thr Ile					
		405		410		415	
		Tyr Glu Asn Leu Ala Pro Val Thr Thr Phe Gly Lys Thr Asn Gly Tyr					
		420		425		430	
		Ile Ala					
25		<210> 34					
		<211> 20					
		<212> Белок					
		<213> Вирус ящура					
		<400> 34					
30		Arg Ala Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu					
		1 5 10 15					
		Asn Pro Gly Pro					
		20					
		<210> 35					
35		<211> 3390					
		<212> ДНК					
		<213> Искусственная последовательность					
		<220>					
		<223> Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие CAR					
40		(MP13974.SFG.aCD19fmc63-CD8STK-CD28tmZ-2A-aCD33glx-HCH2CH3pvaa-CD					
		28tmZw)					
		<400> 35					
		atgagcctgc ccgtgaccgc cctgctgctg cccctggccc tgctgctgca cgccgccaga				60	
		ccagacatcc agatgaccca gaccaccagc agcctgagcg ccagcctggg cgaccgggtg				120	
45		accatcagct gcagagccag ccaggacatc agcaagtacc tgaactggta ccagcagaag				180	
		cccgcgggca ccgtgaagct gctgatctac cacaccagcc ggctgcacag cggcgtgccc				240	
		agccggttca gcggcagcgg cagcggcacc gactacagcc tgaccatcag caacctggag				300	
		caggaggaca tcgccaccta cttctgccag cagggcaaca ccctgcccta caccttcgga				360	

	ggcggcacca	agctggagat	caccaaggcc	ggaggcggag	gctctggcgg	aggcggctct	420
	ggcggaggcg	gctctggcgg	aggcggcagc	gaggtgaagc	tgaggagtc	tgcccaggc	480
	ctggtggccc	caagccagag	cctgagcgtg	acctgcaccg	tgagcggcgt	gagcctgccc	540
	gactacggcg	tgagctggat	caggcagccc	ccacggaagg	gcctggagtg	gctgggcgtg	600
5	atctggggca	gcgagaccac	ctactacaac	agcgccctga	agagccggct	gaccatcatc	660
	aaggacaaca	gcaagagcca	ggtgttcctg	aagatgaaca	gcctgcagac	cgacgacacc	720
	gccatctact	actgcgcca	gcactactac	tatggcggca	gctacgctat	ggactactgg	780
	ggccagggca	ccagcgtgac	cgtgagctca	gatcccacca	cgacgccagc	gccgcgacca	840
	ccaacaccgg	cgcccaccat	cgcgctgcag	cccctgtccc	tgcgcccaga	ggcgtgccgg	900
10	ccagcggcgg	ggggcgcagt	gcacacgagg	gggctggact	tcgcctgtga	tatcttttgg	960
	gtgctggtgg	tggttggtgg	agtcctggct	tgctatagct	tgctagtaac	agtggccttt	1020
	attattttct	gggtgaggag	agtgaagttc	agcaggagcg	cagacgcccc	cgcgctaccag	1080
	cagggccaga	accagctcta	taacgagctc	aatctaggac	gaagagagga	gtacgatgtt	1140
	ttggacaaga	gacgtggccg	ggaccctgag	atggggggaa	agccgagaag	gaagaacctt	1200
15	caggaaggcc	tgtacaatga	actgcagaaa	gataagatgg	cggaggccta	cagtgagatt	1260
	gggatgaaag	gcgagcgccg	gaggggcaag	gggcacgatg	gcctttacca	gggtctcagt	1320
	acagccacca	aggacacctt	cgacgccctt	cacatgcagg	ccctgcctcc	tcgcagagcc	1380
	gagggcaggg	gaagtcttct	aacatgcggg	gacgtggagg	aaaatcccgg	gcccattggc	1440
	gtgcccactc	aggtcctggg	gttgttgcta	ctgtggctta	cagatgccag	atgtgacatc	1500
20	cagatgacac	agtctccatc	ttccctgtct	gcctctgtcg	gagatcgcg	caccatcacc	1560
	tgctgagcaa	gtgaggacat	ttattttaat	ttagtgtggt	atcagcagaa	accaggaaag	1620
	gcccctaagc	tcctgatcta	tgatacaaat	cgcttggcag	atgggggtccc	atcacggttc	1680
	agtggctctg	gatctggcac	acagtatact	ctaaccataa	gtagcctgca	acccgaagat	1740
	ttcgcaacct	attattgtca	acactataag	aattatccgc	tcacgttcgg	tcaggggacc	1800
25	aagctggaaa	tcaaaagatc	tggtggcgga	gggtcaggag	gcggaggcag	cggaggcggt	1860
	ggctcgggag	gcggaggctc	gagatctgag	gtgcagttgg	tggagtctgg	ggcggttg	1920
	gtgcagcctg	gagggctcct	gaggctctcc	tgtgcagcct	caggattcac	tctcagtaat	1980
	tatggcatgc	actggatcag	gcaggctcca	gggaagggtc	tggagtgggt	ctcgtctatt	2040
	agtcttaatg	gtggtagcac	ttactatcga	gactccgtga	agggccgatt	cactatctcc	2100
30	agggacaatg	caaaaagcac	cctctacctt	caaatgaata	gtctgagggc	cgaggacacg	2160
	gccgtctatt	actgtgcagc	acaggacgct	tatacgggag	gttactttga	ttactggggc	2220
	caaggaacgc	tggtcacagt	ctcgtctatg	gatcccgccg	agcccaaata	tcctgacaaa	2280
	actcacacat	gcccaccgtg	cccagcacct	cccgtggccg	gcccgtcagt	cttcctcttc	2340
	ccccaaaac	ccaaggacac	cctcatgatc	gcccggaccc	ctgaggtcac	atgcgtgggtg	2400
35	gtggacgtga	gccacgaaga	ccctgagggtc	aagttcaact	ggtacgtgga	cggcgtggag	2460
	gtgcataatg	ccaagacaaa	gccgcgggag	gagcagtaca	acagcacgta	ccgtgtggtc	2520
	agcgtcctca	ccgtcctgca	ccaggactgg	ctgaatggca	aggagtacaa	gtgcaaggctc	2580
	tccaacaaag	ccctcccagc	cccctcagag	aaaaccatct	ccaaagccaa	agggcagccc	2640
	cgagaaccac	aggtgtacac	cctgccccca	tcccgggatg	agctgaccaa	gaaccaggctc	2700
40	agcctgacct	gcctggtcaa	aggcttctat	cccagcgaca	tcgccgtgga	gtgggagagc	2760
	aatgggcaac	cggagaacaa	ctacaagacc	acgcctcccg	tgctggactc	cgacggctcc	2820
	ttcttcctct	acagcaagct	caccgtggac	aagagcaggt	ggcagcaggg	gaacgtcttc	2880
	tcatgctccg	tgatgcatga	ggccctgcac	aatcactata	cccagaaata	tctgagtctg	2940
	agcccaggca	agaaggaccc	caagttcttg	gtcctggtgg	tgggtggagg	cgtgctggcc	3000
45	tgttactctc	tcctggtgac	cgtggccttc	atcatctttt	gggtgcgctc	ccgggtgaag	3060
	ttttctcgct	ctgccgatgc	cccagcctat	cagcaggggc	agaatcagct	gtacaatgaa	3120
	ctgaacctgg	gcaggcggga	ggagtacgac	gtgctggata	agcggagagg	cagagacccc	3180
	gagatgggcg	gcaaaccacg	gcgcaaaaat	ccccaggagg	gactctataa	cgagctgcag	3240

	aaggacaaaa	tggccgaggc	ctattccgag	atcggcatga	agggagagag	aagacgcgga	3300
	aagggccacg	acggcctgta	tcagggtattg	tccaccgcta	caaaagatac	atatgatgcc	3360
	ctgcacatgc	aggccctgcc	accagatga				3390
	<210>	36					
5	<211>	5154					
	<212>	ДНК					
	<213>	Искусственная последовательность					
	<220>						
	<223>	Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие CAR					
10		(MP14802.SFG.aCD19fmc63_clean-CD8STK-CD28tmZ-2A-aCD33glx-HCH2CH3p					
		vaa-dCD45)					
	<400>	36					
	atgagcctgc	ccgtgaccgc	cctgctgctg	cccctggccc	tgctgctgca	cgccgccaga	60
	ccagacatcc	agatgaccsa	gaccaccagc	agcctgagcg	ccagcctggg	cgaccgggtg	120
15	accatcagct	gcagagccag	ccaggacatc	agcaagtacc	tgaactggta	ccagcagaag	180
	cccgcaggca	ccgtgaagct	gctgatctac	cacaccagcc	ggctgcacag	cggcgtgccc	240
	agccggttca	gcggcagcgg	cagcggcacc	gactacagcc	tgaccatcag	caacctggag	300
	caggaggaca	tcgccaccta	cttctgccag	cagggcaaca	ccctgcccta	caccttcgga	360
	ggcgggacca	agctggagat	caccaaggcc	ggaggcggag	gctctggcgg	aggcggctct	420
20	ggcggaggcg	gctctggcgg	aggcggcagc	gaggtgaagc	tgaggagtc	tgggccaggc	480
	ctgggtggccc	caagccagag	cctgagcgtg	acctgcaccg	tgagcggcgt	gagcctgccc	540
	gactacggcg	tgagctggat	caggcagccc	ccacggaagg	gcctggagtg	gctgggcgtg	600
	atctggggca	gcgagaccac	ctactacaac	agcgccctga	agagccggct	gaccatcatc	660
	aaggacaaca	gcaagagcca	ggtgttcctg	aagatgaaca	gcctgcagac	cgacgacacc	720
25	gccatctact	actgcgcca	gcactactac	tatggcggca	gctacgctat	ggactactgg	780
	ggccaggggca	ccagcgtgac	cgtgagctca	gatcccacca	cgacgccagc	gccgcgacca	840
	ccaacaccgg	cgcccaccat	cgcgctgcag	cccctgtccc	tgcgcccaga	ggcgtgccgg	900
	ccagcggcgg	ggggcgagct	gcacacgagg	gggctggact	tcgcctgtga	tatcttttgg	960
	gtgctggtgg	tgggtggtgg	agtcctggct	tgctatagct	tgctagtaac	agtggccttt	1020
30	attattttct	gggtgaggag	agtgaagttc	agcaggagcg	cagacgcccc	cgcgtaggag	1080
	cagggccaga	accagctcta	taacgagctc	aatctaggac	gaagagagga	gtacgatgtt	1140
	ttggacaaga	gacgtggccg	ggaccctgag	atggggggaa	agccgagaag	gaagaacctt	1200
	caggaaggcc	tgtacaatga	actgcagaaa	gataagatgg	cggaggccta	cagtgagatt	1260
	gggatgaaag	gcgagcgccg	gaggggcaag	gggcacgatg	gcctttacca	gggtctcagt	1320
35	acagccacca	aggacacctt	cgacgcccct	cacatgcagg	ccctgcctcc	tcgcagagcc	1380
	gagggcaggg	gaagtcttct	aacatgcggg	gacgtggagg	aaaatcccgg	gcccattggc	1440
	gtgcccactc	aggctcctgg	gttggttgcta	ctgtggctta	cagatgccag	atgtgacatc	1500
	cagatgacac	agtctccatc	ttccctgtct	gcactctgtc	gagatcgctg	caccatcacc	1560
	tgctcgagcaa	gtgaggacat	ttattttaat	ttagtgtggt	atcagcagaa	accaggaaag	1620
40	gcccctaagc	tcctgatcta	tgatacaaat	cgcttggcag	atgggggtccc	atcacggttc	1680
	agtggctctg	gatctggcac	acagtatact	ctaaccataa	gtagcctgca	acccgaagat	1740
	ttcgcaacct	attattgtca	acactataag	aattatccgc	tcacgttcgg	tcaggggacc	1800
	aagctggaaa	tcaaaagatc	tggtggcgga	gggtcaggag	gcggaggcag	cggaggcggt	1860
	ggctcgggag	gcggaggctc	gagatctgag	gtgcagttgg	tggagtctgg	gggcggcttg	1920
45	gtgcagcctg	gaggggtccct	gaggctctcc	tgtgcagcct	caggattcac	tctcagtaat	1980
	tatggcatgc	actggatcag	gcaggctcca	gggaagggtc	tggagtgggt	ctcgtctatt	2040
	agtcttaatg	gtggtagcac	ttactatcga	gactccgtga	agggccgatt	cactatctcc	2100
	agggacaatg	caaaaagcac	cctctacctt	caaatgaata	gtctgagggc	cgaggacacg	2160

	gccgtctatt	actgtgcagc	acaggacgct	tatacgggag	gttactttga	ttactggggc	2220
	caaggaacgc	tggtcacagt	ctcgtctatg	gatcccgccg	agcccaaadc	tcctgacaaa	2280
	actcacacat	gcccaccgtg	cccagcacct	cccgtggccg	gcccgtcagt	cttcctcttc	2340
	ccccaaaaac	ccaaggacac	cctcatgata	gcccggaccc	ctgaggtcac	atgcgtgggtg	2400
5	gtggacgtga	gccacgaaga	ccctgaggtc	aagttcaact	ggtacgtgga	cggcgtggag	2460
	gtgcataatg	ccaagacaaa	gccgcgggag	gagcagtaca	acagcacgta	ccgtgtgggtc	2520
	agcgtcctca	ccgtcctgca	ccaggactgg	ctgaatggca	aggagtacaa	gtgcaagggtc	2580
	tccaacaaaag	ccctcccagc	ccccatcgag	aaaaccatct	ccaaagccaa	agggcagccc	2640
	cgagaaccac	aggtgtacac	cctgccccca	tcccgggatg	agctgaccaa	gaaccagggtc	2700
10	agcctgacct	gcctggtcaa	aggcttctat	cccagcgaca	tcgccgtgga	gtgggagagc	2760
	aatgggcaac	cggagaacaa	ctacaagacc	acgcctcccc	tgctggactc	cgacgggtcc	2820
	ttcttctctc	acagcaagct	caccgtggac	aagagcaggt	ggcagcaggg	gaacgtcttc	2880
	tcatgctccg	tgatgcatga	ggccctgcac	aatcactata	cccagaaadc	tctgagtctg	2940
	agcccaggca	agaaggaccc	caaggcactg	atagcatttc	tggcatttct	gattattgtg	3000
15	acatcaatat	ccctgcttgt	tggtctctac	aaaatctatg	atctacataa	gaaaagatcc	3060
	tgcaattttag	atgaacagca	ggagcttggt	gaaagggatg	atgaaaaaca	actgatgaat	3120
	gtggagccaa	tccatgcaga	tattttgttg	gaaacttata	agaggaagat	tgctgatgaa	3180
	ggaagacttt	ttctggctga	atttcagagc	atcccgcggg	tgttcagcaa	gtttcctata	3240
	aaggaagctc	gaaagccctt	taaccagaat	aaaaaccgtt	atgttgacat	tcttccttat	3300
20	gattataacc	gtgttgaact	ctctgagata	aacggagatg	caggggtcaaa	ctacataaat	3360
	gccagctata	ttgatggttt	caaagaaccc	aggaaataca	ttgctgcaca	aggtcccagg	3420
	gatgaaactg	ttgatgattt	ctggaggatg	atttgggaac	agaaagccac	agttattgtc	3480
	atggctactc	gatgtgaaga	aggaaacagg	aacaagtgtg	cagaatactg	gccgtcaatg	3540
	gaagagggca	ctcgggcttt	tggagatggt	gttgtaaaga	tcaaccagca	caaaagatgt	3600
25	ccagattaca	tcattcagaa	attgaacatt	gtaaataaaa	aagaaaaagc	aactggaaga	3660
	gaggtgactc	acattcagtt	caccagctgg	ccagaccacg	gggtgcctga	ggatcctcac	3720
	ttgctcctca	aactgagaag	gagagtgaat	gccttcagca	atttcttcag	tggtcccatt	3780
	gtgggtgcaat	gcagtgctgg	tggtgggctg	acaggaacct	atatcggaat	tgatgccatg	3840
	ctagaaggcc	tggaaagccg	gaacaaagtg	gatgtttatg	gttatgttgt	caagctaagg	3900
30	cgacagagat	gcctgatggg	tcaagtagag	gcccagtaca	tcttgatcca	tcaggctttg	3960
	gtggaatata	atcagttttg	agaaacagaa	gtgaatttgt	ctgaattaca	tccatatcta	4020
	cataacatga	agaaaaggga	tccacccagt	gagccgtctc	cactagaggc	tgaattccag	4080
	agacttcctt	catataggag	ctggaggaca	cagcacattg	gaaatcaaga	agaaaaataaa	4140
	agtaaaaaaca	ggaattctaa	tgctatccca	tatgactata	acagagtgcc	acttaaacat	4200
35	gagctggaaa	tgagttaaaga	gagtgagcat	gattcagatg	aatcctctga	tgatgacagt	4260
	gattcagagg	aaccaagcaa	atacatcaat	gcattcttta	taatgagcta	ctggaaacct	4320
	gaagtgatga	ttgctgctca	gggaccactg	aaggagacca	ttggtgactt	ttggcagatg	4380
	atcttccaaa	gaaaagtcaa	agttatttgt	atgctgacag	aactgaaaca	tgagagaccag	4440
	gaaatctgtg	ctcagtactg	gggagaaggga	aagcaaaccat	atggagatat	tgaagttgac	4500
40	ctgaaagaca	cagacaaadc	ttcaacttat	acccttcgtg	tctttgaact	gagacattcc	4560
	aagaggaaaag	actctcgaac	tgtgtaccag	taccaatata	caaactggag	tgtggagcag	4620
	cttcctgcag	aacccaaggga	attaatctct	atgattcagg	tcgtcaaaca	aaaacttccc	4680
	cagaagaatt	cctctgaagg	gaacaagcat	cacaagagta	cacctctact	cattcactgc	4740
	agggatggat	ctcagcaaac	gggaatatatt	tgtgctttgt	taaatctctt	agaaagtgcg	4800
45	gaaacagaag	aggtagtgga	tattttttcaa	gtggtaaaaag	ctctacgcaa	agctaggcca	4860
	ggcatgggtt	ccacattcga	gcaatatcaa	ttcctatatg	acgtcattgc	cagcacctac	4920
	cctgctcaga	atggacaagt	aaagaaaaaac	aaccatcaag	aagataaaaat	tgaatttgat	4980
	aatgaagtgg	acaaagtaaa	gcaggatgct	aattgtgtta	atccacttgg	tgccccagaa	5040

	aagctccctg aagcaaagga acaggctgaa ggttctgaac ccacgagtgg cactgagggg	5100
	ccagaacatt ctgtcaatgg tcctgcaagt ccagctttaa atcaagggtc atag	5154
	<210> 37	
	<211> 4053	
5	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие CAR	
10	(MP14801.SFG.aCD19fmc63_clean-CD8STK-CD28tmZ-2A-aCD33glx-HCH2CH3p vaa-dCD148)	
	<400> 37	
	atgagcctgc ccgtgaccgc cctgctgctg cccctggccc tgctgctgca cgccgccaga	60
	ccagacatcc agatgaccca gaccaccagc agcctgagcg ccagcctggg cgaccgggtg	120
	accatcagct gcagagccag ccaggacatc agcaagtacc tgaactggta ccagcagaag	180
15	cccgcaggca ccgtgaagct gctgatctac cacaccagcc ggctgcacag cggcgtgccc	240
	agccgggttca gcggcagcgg cagcggcacc gactacagcc tgaccatcag caacctggag	300
	caggaggaca tcgccacctt cttctgccag cagggcaaca ccctgcccta caccttcgga	360
	ggcggcacca agctggagat caccaaggcc ggaggcggag gctctggcgg aggcggctct	420
	ggcggaggcg gctctggcgg aggcggcagc gaggtgaagc tgcaggagtc tggcccaggc	480
20	ctgggtggccc caagccagag cctgagcgtg acctgcaccg tgagcggcgt gagcctgccc	540
	gactacggcg tgagctggat caggcagccc ccacggaagg gcctggagtg gctgggcgtg	600
	atctggggca gcgagaccac ctactacaac agcgcctga agagccggct gaccatcatc	660
	aaggacaaca gcaagagcca ggtgttcctg aagatgaaca gcctgcagac cgacgacacc	720
	gccatctact actgcgcca gcaactactac tatggcggca gctacgctat ggactactgg	780
25	ggccagggca ccagcgtgac cgtgagctca gatcccacca cgacgccagc gccgcgacca	840
	ccaacaccgg cgccaccat cgcgtcgcag cccctgtccc tgcgccaga ggcgtgccgg	900
	ccagcggcgg ggggcgcagt gcacacgagg gggctggact tcgcctgtga tatcttttgg	960
	gtgctggtgg tggttggtgg agtcctggct tgctatagct tgctagtaac agtggccttt	1020
	attattttct gggtgaggag agtgaagttc agcaggagcg cagacgcccc cgcgtaccag	1080
30	cagggccaga accagctcta taacgagctc aatctaggac gaagagagga gtacgatgtt	1140
	ttggacaaga gacgtggccg ggaccctgag atggggggaa agccgagaag gaagaaccct	1200
	cagggaaggcc tgtacaatga actgcagaaa gataagatgg cggaggccta cagtgaatt	1260
	gggatgaaag gcgagcgccg gaggggcaag gggcacgatg gcctttacca gggctctagt	1320
	acagccacca aggacacctt cgacgccctt cacatgcagg ccctgcctcc tcgcagagcc	1380
35	gagggcaggg gaagtcttct aacatgcggg gacgtggagg aaaatcccgg gcccatggcc	1440
	gtgcccactc aggtcctggg gttgttgcta ctgtggctta cagatgccag atgtgacatc	1500
	cagatgacac agtctccatc ttccctgtct gcatctgtcg gagatcgcgt caccatcacc	1560
	tgctgagcaa gtgaggacat ttattttaat ttagtgtggt atcagcagaa accaggaaag	1620
	gcccctaagc tcctgatcta tgatacaaat cgcttggcag atgggggtccc atcacggttc	1680
40	agtggctctg gatctggcac acagtatact ctaaccataa gtagcctgca acccgaagat	1740
	ttcgcaacct attattgtca acactataag aattatccgc tcacgttcgg tcaggggacc	1800
	aagctggaaa tcaaaagatc tggtggcgga gggtcaggag gcggaggcag cggaggcgg	1860
	ggctcgggag gcggaggctc gagatctgag gtgcagttgg tggagtctgg gggcggcttg	1920
	gtgcagcctg gaggggtccct gaggtctctc tgtgcagcct caggattcac tctcagtaat	1980
45	tatggcatgc actggatcag gcaggctcca ggggaagggtc tggagtgggt ctctctatt	2040
	agtcttaatg gtggtagcac ttactatcga gactccgtga agggccgatt cactatctcc	2100
	agggacaatg caaaaagcac cctctacctt caaatgaata gtctgagggc cgaggacacg	2160
	gccgtctatt actgtgcagc acaggacgct tatacgggag gttactttga ttactggggc	2220

	caaggaacgc	tggtcacagt	ctcgtctatg	gatccccgccg	agcccaaadc	tcctgacaaa	2280
	actcacacat	gcccaccgtg	cccagcacct	cccgtggccg	gcccgtcagt	cttcctcttc	2340
	ccccaaaac	ccaaggacac	cctcatgata	gcccggaccc	ctgaggtcac	atgctgtgtg	2400
	gtggacgtga	gccacgaaga	ccctgaggtc	aagtccaact	ggtacgtgga	cggcgtggag	2460
5	gtgcataatg	ccaagacaaa	gccgcgggag	gagcagtaca	acagcacgta	ccgtgtggtc	2520
	agcgtcctca	ccgtcctgca	ccaggactgg	ctgaatggca	aggagtacaa	gtgcaaggtc	2580
	tccaacaaag	ccctcccagc	ccccatcgag	aaaaccatct	ccaaagccaa	agggcagccc	2640
	cgagaaccac	aggtgtacac	cctgccccca	tcccgggatg	agctgaccaa	gaaccaggtc	2700
	agcctgacct	gcctgggtcaa	aggcttctat	cccagcgaca	tcgccgtgga	gtgggagagc	2760
10	aatgggcaac	cggagaacaa	ctacaagacc	acgcctcccc	tgctggactc	cgacggctcc	2820
	ttcttcctct	acagcaagct	caccgtggac	aagagcaggt	ggcagcaggg	gaacgtcttc	2880
	tcatgctccg	tgatgcatga	ggccctgcac	aatcactata	cccagaaatc	tctgagtctg	2940
	agcccaggca	agaaggaccc	caaggcgggt	tttggctgta	tctttgggtc	cctgggtatt	3000
	gtgactgtgg	gaggcttcat	cttctggaga	aagaagagga	aagatgcaaa	gaataatgaa	3060
15	gtgtcctttt	ctcaaatata	acctaataaaa	tctaagttaa	tcagagtggg	gaatttttag	3120
	gcctacttca	agaagcagca	agctgactcc	aactgtgggt	tcgcagagga	atacgaagat	3180
	ctgaagcttg	ttggaattag	tcaacctaaa	tatgcagcag	aactggctga	gaatagagga	3240
	aagaatcgct	ataataatgt	tctgccctat	gatatttccc	gtgtcaaaact	ttcgggtccag	3300
	acccattcaa	cggatgacta	catcaatgcc	aactacatgc	ctggctacca	ctccaagaaa	3360
20	gattttattg	ccacacaagg	acctttaccg	aacactttga	aagatttttg	gcgtatgggt	3420
	tgggagaaaa	atgtatatgc	catcattatg	ttgactaaat	gtgttgaaca	gggaagaacc	3480
	aaatgtgagg	agtattggcc	ctccaagcag	gctcaggact	atggagacat	aactgtggca	3540
	atgacatcag	aaattgttct	tccggaatgg	accatcagag	atttcacagt	gaaaaatata	3600
	cagacaagtg	agagtcaccc	tctgagacag	ttccatttca	cctcctggcc	agaccacggt	3660
25	gttcccagaca	ccactgacct	gctcatcaac	ttccggtacc	tcgttcgtga	ctacatgaag	3720
	cagagtcctc	ccgaatcgcc	gattctgggtg	cattgcagtg	ctggggctcg	aaggacgggc	3780
	actttcattg	ccattgatcg	tctcatctac	cagatagaga	atgagaacac	cgtggatgtg	3840
	tatgggattg	tgtatgacct	tcgaatgcat	aggcctttaa	tgggtgcagac	agaggaccag	3900
	tatgttttcc	tcaatcagtg	tgttttggat	attgtcagat	cccagaaaga	ctcaaaagta	3960
30	gatcttatct	accagaacac	aactgcaatg	acaatctatg	aaaaccttgc	gcccgtgacc	4020
	acatttggaa	agaccaatgg	ttacatcgcc	taa			4053
	<210>	38					
	<211>	3345					
	<212>	ДНК					
35	<213>	Искусственная последовательность					
	<220>						
	<223>	Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие CAR					
		(16076.SFG.aCD19fmc63-CD8STK-CD28tmZ-2A-aCD33glx-muCD8STK-tm-dPTP					
		N6)					
40	<400>	38					
	atgagcctgc	ccgtgaccgc	cctgctgctg	cccctggccc	tgctgctgca	cgccgccaga	60
	ccagacatcc	agatgaccga	gaccaccagc	agcctgagcg	ccagcctggg	cgaccgggtg	120
	accatcagct	gcagagccag	ccaggacatc	agcaagtacc	tgaactggta	ccagcagaag	180
	cccgcaggca	ccgtgaagct	gctgatctac	cacaccagcc	ggctgcacag	cggcgtgccc	240
45	agccgggtca	gcggcagcgg	cagcggcacc	gactacagcc	tgaccatcag	caacctggag	300
	caggaggaca	tcgccaccta	cttctgccag	cagggcaaca	ccctgcccta	caccttcgga	360
	ggcggcacca	agctggagat	caccaaggcc	ggaggcggag	gctctggcgg	agggcgctct	420
	ggcggaggcg	gctctggcgg	aggcggcagc	gaggtgaagc	tgaggagtc	tgggccaggc	480

	ctggtggccc	caagccagag	cctgagcgtg	acctgcaccg	tgagcggcgt	gagcctgccc	540
	gactacggcg	tgagctggat	caggcagccc	ccacggaagg	gcctggagtg	gctgggctg	600
	atctggggca	gcgagaccac	ctactacaac	agcgccctga	agagccggct	gaccatcatc	660
	aaggacaaca	gcaagagcca	ggtgttcctg	aagatgaaca	gcctgcagac	cgacgacacc	720
5	gccatctact	actgcgcca	gcactactac	tatggcggca	gctacgctat	ggactactgg	780
	ggccagggca	ccagcgtgac	cgtgagctca	gatcccacca	cgacgccagc	gccgcgacca	840
	ccaacaccgg	cgcccaccat	cgcgctcgag	cccctgtccc	tgcgcccaga	ggcgtgccgg	900
	ccagcggcgg	ggggcgagc	gcacacgagg	gggctggact	tcgcctgtga	tatcttttgg	960
	gtgctggtgg	tggttggtgg	agtccctggc	tgctatagct	tgctagtaac	agtggccttt	1020
10	attattttct	gggtgaggag	agtgaagttc	agcaggagcg	cagacgcccc	cggtaccag	1080
	cagggccaga	accagctcta	taacgagctc	aatctaggac	gaagagagga	gtacgatgtt	1140
	ttggacaaga	gacgtggccg	ggaccctgag	atggggggaa	agccgagaag	gaagaacctt	1200
	caggaaggcc	tgtacaatga	actgcagaaa	gataagatgg	cggaggccta	cagtgaattt	1260
	gggatgaaag	gcgagcgccg	gaggggcaag	gggcacgatg	gcctttacca	gggtctcagt	1320
15	acagccacca	aggacacctt	cgacgccctt	cacatgcagg	ccctgcctcc	tcgcagagcc	1380
	gagggcaggg	gaagtcttct	aacatgcggg	gacgtggagg	aaaatcccgg	gcccattggc	1440
	gtgcccactc	aggtccctgg	gttgttgcta	ctgtggctta	cagatgccag	atgtgacatc	1500
	cagatgacac	agtctccatc	ttccctgtct	gcctctgtcg	gagatcgctg	caccatcacc	1560
	tgctcgagca	gtgaggacat	ttattttaat	ttagtgtggt	atcagcagaa	accaggaaag	1620
20	gcccctaagc	tcctgatcta	tgatacaaat	cgcttggcag	atgggggtccc	atcacggttc	1680
	agtggctctg	gatctggcac	acagtatact	ctaaccataa	gtagcctgca	acccgaagat	1740
	ttcgcaacct	attattgtca	acactataag	aattatccgc	tcacgttcgg	tcaggggacc	1800
	aagctggaaa	tcaaaagatc	tggtggcgga	gggtcaggag	gcggaggcag	cggaggcggt	1860
	ggctcgggag	gcggaggctc	gagatctgag	gtgcagttgg	tggagtctgg	gggcggcttg	1920
25	gtgcagcctg	gaggggtccct	gaggctctcc	tgtgcagcct	caggattcac	tctcagtaat	1980
	tatggcatgc	actggatcag	gcaggctcca	gggaagggtc	tggagtgggt	ctcgtctatt	2040
	agtcttaatg	gtggtagcac	ttactatcga	gactccgtga	agggccgatt	cactatctcc	2100
	agggacaatg	caaaaagcac	cctctacctt	caaatgaata	gtctgagggc	cgaggacacg	2160
	gccgtctatt	actgtgcagc	acaggacgct	tatacgggag	gttactttga	ttactggggc	2220
30	caaggaacgc	tggtcacagt	ctcgtctatg	gatcccgcca	ccacaaccaa	gcccgtgctg	2280
	cggaccccaa	gccctgtgca	ccctaccggc	accagccagc	ctcagagacc	cgaggactgc	2340
	cggcctcggg	gcagcgtgaa	gggcaccggc	ctggacttcg	cctgcgacat	ctactgggca	2400
	cctctggccg	gaatatgcgt	ggcactgctg	ctgagcctca	tcacaccctt	gatctgttat	2460
	caccgaagcc	gcaagcgggt	gtgtaaaagt	ggaggcgga	gcttctggga	ggagtttgag	2520
35	agtttgagca	agcaggaggt	gaagaacttg	caccagcgct	tgggaaggga	gcggccagag	2580
	aacaagggca	agaaccgcta	caagaacatt	ctcccctttg	accacagccg	agtgatcctg	2640
	cagggacggg	acagtaacat	ccccgggtcc	gactacatca	atgccaacta	catcaagaac	2700
	cagctgctag	gccctgatga	gaacgctaag	acctacatcg	ccagccaggg	ctgtctggag	2760
	gccacggtca	atgacttctg	gcagatggcg	tggcaggaga	acagccgtgt	catcgtcatg	2820
40	accacccgag	aggtggagaa	aggccggaac	aatgctgtcc	catactggcc	cgaggtgggc	2880
	atgcagcgtg	cttatggggc	ctactctgtg	accaactgcg	gggagcatga	cacaaccgaa	2940
	tacaaactcc	gtaccttaca	ggtctccccg	ctggacaatg	gagacctgat	tcgggagatc	3000
	tggcattacc	agtacctgag	ctggccccgac	cacgggggtcc	ccagtgaagg	tgggggtgtc	3060
	ctcagcttcc	tggaccagat	caaccagcgg	caggaaagtc	tgcttcacgc	agggcccatc	3120
45	atcgtgcact	gcagcgccgg	catcgccggc	acaggcacca	tcattgtcat	cgacatgctc	3180
	atggagaaca	tctccaccaa	gggcctggac	tgtgacattg	acatccagaa	gaccatccag	3240
	atgggtgcgg	cgacgcgtc	gggcatggtg	cagacggagg	cgagtagaaa	gttcatctac	3300
	gtggccatcg	cccagttcat	tgaaaccact	aagaagaagc	tgtga		3345

	<210>	39	
	<211>	2757	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
5	<220>		
	<223>	Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие CAR (MP16091.SFG.aCD19fmc63-CD8STK-CD28tmZ-2A-aCD33glx-muCD8STK-LAIR1 tm-endo)	
	<400>	39	
10		atgagcctgc ccgtgaccgc cctgctgctg cccctggccc tgctgctgca cgccgccaga 60	
		ccagacatcc agatgaccga gaccaccagc agcctgagcg ccagcctggg cgaccgggtg 120	
		accatcagct gcagagccag ccaggacatc agcaagtacc tgaactggta ccagcagaag 180	
		cccgcaggca ccgtgaagct gctgatctac cacaccagcc ggctgcacag cggcgtgccc 240	
		agccggttca gcggcagcgg cagcggcacc gactacagcc tgaccatcag caacctggag 300	
15		caggaggaca tcgccacctt cttctgccag cagggcaaca ccctgcccta caccttcgga 360	
		ggcggcacca agctggagat caccaaggcc ggaggcggag gctctggcgg aggcggctct 420	
		ggcggaggcg gctctggcgg aggcggcagc gaggtgaagc tgcaggagtc tggcccaggc 480	
		ctggtggccc caagccagag cctgagcgtg acctgcaccg tgagcggcgt gagcctgccc 540	
		gactacggcg tgagctggat caggcagccc ccacggaagg gcctggagtg gctgggctg 600	
20		atctggggca gcgagaccac ctactacaac agcgccctga agagccggct gaccatcatc 660	
		aaggacaaca gcaagagcca ggtgttcctg aagatgaaca gcctgcagac cgacgacacc 720	
		gccatctact actgcgcca gactactac tatggcggca gctacgctat ggactactgg 780	
		ggccagggca ccagcgtgac cgtgagctca gatcccacca cgacgccagc gccgcgacca 840	
		ccaacaccgg cgcaccacat cgcgtcgcag cccctgtccc tgcgcccaga ggcgtgccgg 900	
25		ccagcggcgg ggggcgcagt gcacacgagg gggctggact tcgcctgtga tatcttttgg 960	
		gtgctggtgg tggttggtgg agtcctggct tgctatagct tgctagtaac agtggccttt 1020	
		attattttct gggtgaggag agtgaagttc agcaggagcg cagacgccc cgcgtaccag 1080	
		cagggccaga accagctcta taacgagctc aatctaggac gaagagagga gtacgatgtt 1140	
		ttggacaaga gacgtggccg ggaccctgag atggggggaa agccgagaag gaagaaccct 1200	
30		caggaaggcc tgtacaatga actgcagaaa gataagatgg cggaggccta cagtgaattt 1260	
		gggatgaaag gcgagcgcgg gaggggcaag gggcacgatg gcctttacca gggctctcagt 1320	
		acagccacca aggacacctt cgacgccctt cacatgcagg ccctgcctcc tcgcagagcc 1380	
		gagggcaggg gaagtcttct aacatgcggg gacgtggagg aaaatcccgg gcccatggcc 1440	
		gtgcccactc aggtcctggg gttgttgcta ctgtggctta cagatgccag atgtgacatc 1500	
35		cagatgacac agtctccatc ttccctgtct gcatctgtcg gagatcgcgt caccatcacc 1560	
		tgctcagcaa gtgaggacat ttattttaat ttagtgtggg atcagcagaa accaggaaag 1620	
		gcccctaagc tcctgatcta tgatacaaat cgcttggcag atgggggtccc atcacggttc 1680	
		agtggctctg gatctggcac acagtatact ctaaccataa gtagcctgca acccgaagat 1740	
		ttcgcaacct attattgtca acactataag aattatccgc tcacgttcgg tcaggggacc 1800	
40		aagctggaaa tcaaaagatc tggtggcgga gggtcaggag gcggaggcag cggaggcgg 1860	
		ggctcgggag gcggaggctc gagatctgag gtgcagttgg tggagtctgg gggcggcttg 1920	
		gtgcagcctg gagggctcct gaggtctctc tgtgcagcct caggattcac tctcagtaat 1980	
		tatggcatgc actggatcag gcaggctcca gggaagggtc tggagtgggt ctctgtctatt 2040	
		agtcttaatg gtggtagcac ttactatcga gactccgtga agggccgatt cactatctcc 2100	
45		agggacaatg caaaaagcac cctctacctt caaatgaata gtctgagggc cgaggacacg 2160	
		gccgtctatt actgtgcagc acaggacgct tatacgggag gttactttga ttactggggc 2220	
		caaggaacgc tggtcacagt ctctgtctat gatcccgcca ccacaaccaa gccctgtctg 2280	
		cggaccccaa gccctgtgca ccctaccggc accagccagc ctcagagacc cgaggactgc 2340	

	cggcctcggg	gcagcgtgaa	gggcaccggc	ctggacttcg	cctgcgacat	tctcatcggg	2400
	gtctcagtgg	tcttcctctt	ctgtctcctc	ctcctgggtc	tcttctgcct	ccatcgccag	2460
	aatcagataa	agcagggggc	ccccagaagc	aaggacgagg	agcagaagcc	acagcagagg	2520
	cctgacctgg	ctgttgatgt	tctagagagg	acagcagaca	aggccacagt	caatggactt	2580
5	cctgagaagg	accgggagac	cgacaccagc	gccctggctg	cagggagttc	ccaggaggtg	2640
	acgtatgctc	agctggacca	ctggggccctc	acacagagga	cagcccgggc	tgtgtcccca	2700
	cagtccacaa	agcccatggc	cgagtccatc	acgtatgcag	ccgttgccag	acactga	2757
	<210> 40						
	<211> 4092						
10	<212> ДНК						
	<213> Искусственная последовательность						
	<220>						
	<223> Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие CAR						
	(MP16092.SFG.aCD19fmc63-CD8STK-CD28tmZ-2A-aCD33glx-muCD8STK-LAIR1						
15	tm-endo-2A-PTPN6_SH2-dCD148)						
	<400> 40						
	atgagcctgc	ccgtgaccgc	cctgctgctg	cccctggccc	tgctgctgca	cgccgccaga	60
	ccagacatcc	agatgaccca	gaccaccagc	agcctgagcg	ccagcctggg	cgaccgggtg	120
	accatcagct	gcagagccag	ccaggacatc	agcaagtacc	tgaactggta	ccagcagaag	180
20	cccgcaggca	ccgtgaagct	gctgatctac	cacaccagcc	ggctgcacag	cggcgtgccc	240
	agccggttca	gcggcagcgg	cagcggcacc	gactacagcc	tgaccatcag	caacctggag	300
	caggaggaca	tcgccaccta	cttctgccag	cagggcaaca	ccctgcccta	caccttcgga	360
	ggcggcacca	agctggagat	caccaaggcc	ggaggcggag	gctctggcgg	aggcggctct	420
	ggcggaggcg	gctctggcgg	aggcggcagc	gaggtgaagc	tgaggagtc	tgggccaggc	480
25	ctgggtggccc	caagccagag	cctgagcgtg	acctgcaccg	tgagcggcgt	gagcctgccc	540
	gactacggcg	tgagctggat	caggcagccc	ccacggaagg	gcctggagtg	gctgggcgtg	600
	atctggggca	gcgagaccac	ctactacaac	agcgccctga	agagccggct	gaccatcatc	660
	aaggacaaca	gcaagagcca	ggtgttcctg	aagatgaaca	gcctgcagac	cgacgacacc	720
	gccatctact	actgcgcca	gcactactac	tatggcggca	gctacgctat	ggactactgg	780
30	ggccagggca	ccagcgtgac	cgtgagctca	gatcccacca	cgacgccagc	gccgcgacca	840
	ccaacaccgg	cgcccaccat	cgcgctgcag	cccctgtccc	tgcgcccaga	ggcgtgccgg	900
	ccagcggcgg	ggggcgcagt	gcacacgagg	gggtggact	tcgcctgtga	tatcttttgg	960
	gtgctggtgg	tggttggtgg	agtcctggct	tgctatagct	tgctagtaac	agtggccttt	1020
	attattttct	gggtgaggag	agtgaagttc	agcaggagcg	cagacgcccc	cgcgtaggag	1080
35	cagggccaga	accagctcta	taacgagctc	aatctaggac	gaagagagga	gtacgatgtt	1140
	ttggacaaga	gacgtggccg	ggaccctgag	atggggggaa	agccgagaag	gaagaaccct	1200
	caggaaggcc	tgtacaatga	actgcagaaa	gataagatgg	cggaggccta	cagtgaatt	1260
	gggatgaaag	gcgagcgccg	gaggggcaag	gggcacgatg	gcctttacca	gggtctcagt	1320
	acagccacca	aggacacctc	cgacgccctt	cacatgcagg	ccctgcctcc	tcgcagagcc	1380
40	gagggcaggg	gaagtcttct	aacatgcggg	gacgtggagg	aaaatcccgg	gcccattggc	1440
	gtgcccactc	aggctcctggg	gttgttgcta	ctgtggctta	cagatgccag	atgtgacatc	1500
	cagatgacac	agtctccatc	ttccctgtct	gcctctgtcg	gagatcgctg	caccatcacc	1560
	tgctgagcaa	gtgaggacat	ttattttaat	ttagtgtggt	atcagcagaa	accaggaaag	1620
	gcccctaagc	tcctgatcta	tgatacaaat	cgcttggcag	atgggggtccc	atcacggttc	1680
45	agtggctctg	gatctggcac	acagtatact	ctaaccataa	gtagcctgca	acccgaagat	1740
	ttcgcaacct	attattgtca	acactataag	aattatccgc	tcacgttcgg	tcaggggacc	1800
	aagctggaaa	tcaaaagatc	tggtggcgga	gggtcaggag	gcggaggcag	cggaggcggt	1860
	ggctcggggg	gcggaggctc	gagatctgag	gtgcagttgg	tggagtctgg	gggcggcttg	1920

gtgcagcctg gaggggtccct gaggctctcc tgtgcagcct caggattcac tctcagtaat 1980
tatggcatgc actggatcag gcaggctcca gggaagggtc tggagtgggt ctctgtctatt 2040
agtcttaatg gtggtagcac ttactatcga gactccgtga agggccgatt cactatctcc 2100
agggacaatg caaaaagcac cctctacctt caaatgaata gtctgagggc cgaggacacg 2160
5 gccgtctatt actgtgcagc acaggacgct tatacgggag gttactttga ttactggggc 2220
caaggaacgc tgggtcacagt ctctgtctatg gatccccgcca ccacaaccaa gcccggtgctg 2280
cggaccccaa gccctgtgca ccctaccggc accagccagc ctgagagacc cgaggactgc 2340
cggcctcggg gcagcgtgaa gggcaccggc ctggacttcg cctgcgacat tctcatcggg 2400
gtctcagtgg tcttctctctt ctgtctctctc ctctgtgtcc tcttctgcct ccatcgccag 2460
10 aatcagataa agcagggggc ccccgaaagc aaggacgagg agcagaagcc acagcagagg 2520
cctgacctgg ctggtgatgt tctagagagg acagcagaca aggccacagt caatggactt 2580
cctgagaagg accgggagac cgacaccagc gccctgggctg caggaggttc ccaggaggtg 2640
acgtatgctc agctggacca ctggggccctc acacagagga cagcccgggc tgtgtcccca 2700
cagtcacaaa agcccatggc cgagtccatc acgtatgcag ccgttgccag acacagggca 2760
15 gaaggaagag gtagcctgct gacttgccggg gacgtggaag agaaccagg gccatggtat 2820
catggccaca tgtctggcgg gcaggcagag acgtgctgctc aggccaaagg cgagccctgg 2880
acgtttcttg tgcgtgagag cctcagccag cctggagact tcgtgctttc tgtgtcagt 2940
gaccagccca aggctggccc aggctccccg ctgagggtca cccacatcaa ggtcatgtgc 3000
gaggggtggac gctacacagt ggggtggtttg gagaccttcg acagcctcac ggacctggtg 3060
20 gagcatttca agaagacggg gattgaggag gcctcaggcg cctttgtcta cctgcggcag 3120
ccgtacagcg gtggcggtgg cagctttgag gcctacttca agaagcagca agctgactcc 3180
aactgtgggt tcgcagagga atacgaagat ctgaagcttg ttggaattag tcaacctaaa 3240
tatgcagcag aactggctga gaatagagga aagaatcgct ataataatgt tctgccctat 3300
gatatctccc gtgtcaaaact ttccggtccag acccattcaa cggatgacta catcaatgcc 3360
25 aactacatgc ctggctacca ctccaagaaa gattttattg ccacacaagg acctttaccg 3420
aacactttga aagatttttg gcgtatggtt tgggagaaaa atgtatatgc catcattatg 3480
ttgactaaat gtgttgaaca gggaagaacc aaatgtgagg agtattggcc ctccaagcag 3540
gctcaggact atggagacat aactgtggca atgacatcag aaattgttct tccggaatgg 3600
accatcagag atttcacagt gaaaaatatc cagacaagtg agagtcaccc tctgagacag 3660
30 ttccatttca cctcctggcc agaccacggt gttccccgaca ccactgacct gctcatcaac 3720
ttccgggtacc tcgttcgtga ctacatgaag cagagtcctc ccgaatcgcc gattctggtg 3780
cattgcagtg ctggggtcgg aaggacgggc actttcattg ccattgatcg tctcatctac 3840
cagatagaga atgagaacac cgtggatgtg tatgggattg tgtatgacct tcgaatgcat 3900
aggcctttta tgggtgcagac agaggaccag tatgttttcc tcaatcagtg tgttttggat 3960
35 attgtcagat cccagaaaga ctcaaaaagta gatcttatct accagaacac aactgcaatg 4020
acaatctatg aaaaccttgc gcccggtgacc acatttggaag agaccaatgg ttacatcgcc 4080
agcggtagct aa 4092

<210> 41

<211> 1341

40 <212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv)

SFG.aCD19-CD8STK-CD28tmZ-2A-aGD2-HCH2CH3pvaa-dCD148

45 <400> 41

Met Ser Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu

RU 2717984 C2

		20		25		30											
		Ser	Ala	Ser	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln
		35							40					45			
5		Asp	Ile	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr
		50						55					60				
		Val	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	His	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro
		65					70					75				80	
		Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile
						85					90					95	
10		Ser	Asn	Leu	Glu	Gln	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly
					100					105					110		
		Asn	Thr	Leu	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Thr
					115				120					125			
		Lys	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
15					130				135				140				
		Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly
		145					150					155				160	
		Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly
					165						170					175	
20		Val	Ser	Leu	Pro	Asp	Tyr	Gly	Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Arg
					180					185					190		
		Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Tyr
					195				200					205			
		Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ile	Lys	Asp	Asn	Ser
25					210				215					220			
		Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Thr	Asp	Asp	Thr
		225					230					235				240	
		Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala
					245						250					255	
30		Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Asp	Pro
					260					265						270	
		Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala
					275					280					285		
		Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly
35					290				295				300				
		Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Phe	Trp
		305					310					315				320	
		Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val
					325						330					335	
40		Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg
					340					345					350		
		Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn
					355					360					365		
		Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg
45					370				375				380				
		Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro
		385					390					395				400	
		Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala

RU 2717984 C2

				405					410				415			
	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His
				420					425				430			
	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp
5			435					440					445			
	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	Arg	Ala	Glu	Gly	Arg	Gly
			450				455					460				
	Ser	Leu	Leu	Thr	Cys	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Glu
	465					470					475				480	
10	Thr	Asp	Thr	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Pro	Gly	Ser
				485					490				495			
	Thr	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro
				500					505				510			
	Ser	Gln	Thr	Leu	Ser	Ile	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ala
15			515					520				525				
	Ser	Tyr	Asn	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
			530				535					540				
	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Ala	Gly	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ala
	545					550				555					560	
20	Leu	Met	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Gln	Val
				565					570				575			
	Phe	Leu	Lys	Met	Ser	Ser	Leu	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
				580					585				590			
	Cys	Ala	Lys	Arg	Ser	Asp	Asp	Tyr	Ser	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln
25			595					600				605				
	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
			610				615					620				
	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Asn	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser
	625					630					635				640	
30	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Arg	Ala
				645						650				655		
	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser
				660				665					670			
	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Val	Trp	Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser
35			675					680					685			
	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr
			690				695					700				
	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys
	705					710					715				720	
40	Gln	Gln	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Pro	Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val
				725						730				735		
	Glu	Ile	Lys	Arg	Ser	Asp	Pro	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Pro	Asp	Lys	Thr
				740					745				750			
	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val
45			755					760					765			
	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ala	Arg	Thr
			770				775					780				
	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu

RU 2 717 984 C2

	785	790						795						800			
	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	
					805					810					815		
5	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	
				820					825					830			
	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	
			835					840					845				
	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	
		850					855					860					
10	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	
	865					870					875					880	
	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	
				885						890					895		
15	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	
			900						905					910			
	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	
		915						920					925				
	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	
		930					935					940					
20	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	
	945					950					955					960	
	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Lys	
				965						970					975		
	Asp	Pro	Lys	Ala	Val	Phe	Gly	Cys	Ile	Phe	Gly	Ala	Leu	Val	Ile	Val	
25			980						985				990				
	Thr	Val	Gly	Gly	Phe	Ile	Phe	Trp	Arg	Lys	Lys	Arg	Lys	Asp	Ala	Lys	
		995						1000					1005				
	Asn	Asn	Glu	Val	Ser	Phe	Ser	Gln	Ile	Lys	Pro	Lys	Lys	Ser	Lys		
		1010					1015					1020					
30	Leu	Ile	Arg	Val	Glu	Asn	Phe	Glu	Ala	Tyr	Phe	Lys	Lys	Gln	Gln		
		1025					1030					1035					
	Ala	Asp	Ser	Asn	Cys	Gly	Phe	Ala	Glu	Glu	Tyr	Glu	Asp	Leu	Lys		
		1040					1045					1050					
	Leu	Val	Gly	Ile	Ser	Gln	Pro	Lys	Tyr	Ala	Ala	Glu	Leu	Ala	Glu		
35		1055					1060					1065					
	Asn	Arg	Gly	Lys	Asn	Arg	Tyr	Asn	Asn	Val	Leu	Pro	Tyr	Asp	Ile		
		1070					1075					1080					
	Ser	Arg	Val	Lys	Leu	Ser	Val	Gln	Thr	His	Ser	Thr	Asp	Asp	Tyr		
		1085					1090					1095					
40	Ile	Asn	Ala	Asn	Tyr	Met	Pro	Gly	Tyr	His	Ser	Lys	Lys	Asp	Phe		
		1100					1105					1110					
	Ile	Ala	Thr	Gln	Gly	Pro	Leu	Pro	Asn	Thr	Leu	Lys	Asp	Phe	Trp		
		1115					1120										

	1160		1165		1170
	Ser Glu Ile Val Leu Pro Glu Trp Thr Ile Arg Asp Phe Thr Val				
	1175		1180		1185
	Lys Asn Ile Gln Thr Ser Glu Ser His Pro Leu Arg Gln Phe His				
5	1190		1195		1200
	Phe Thr Ser Trp Pro Asp His Gly Val Pro Asp Thr Thr Asp Leu				
	1205		1210		1215
	Leu Ile Asn Phe Arg Tyr Leu Val Arg Asp Tyr Met Lys Gln Ser				
	1220		1225		1230
10	Pro Pro Glu Ser Pro Ile Leu Val His Cys Ser Ala Gly Val Gly				
	1235		1240		1245
	Arg Thr Gly Thr Phe Ile Ala Ile Asp Arg Leu Ile Tyr Gln Ile				
	1250		1255		1260
	Glu Asn Glu Asn Thr Val Asp Val Tyr Gly Ile Val Tyr Asp Leu				
15	1265		1270		1275
	Arg Met His Arg Pro Leu Met Val Gln Thr Glu Asp Gln Tyr Val				
	1280		1285		1290
	Phe Leu Asn Gln Cys Val Leu Asp Ile Val Arg Ser Gln Lys Asp				
	1295		1300		1305
20	Ser Lys Val Asp Leu Ile Tyr Gln Asn Thr Thr Ala Met Thr Ile				
	1310		1315		1320
	Tyr Glu Asn Leu Ala Pro Val Thr Thr Phe Gly Lys Thr Asn Gly				
	1325		1330		1335
	Tyr Ile Ala				
25	1340				
	<210> 42				
	<211> 4026				
	<212> ДНК				
	<213> Искусственная последовательность				
30	<220>				
	<223> Одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv)				
	SFG.aCD19-CD8STK-CD28tmZ-2A-aGD2-HCH2CH3pvaa-dCD148				
	<400> 42				
	atgagcctgc ccgtgaccgc cctgctgctg cccctggccc tgctgctgca cgccgccaga				60
35	ccagacatcc agatgaccga gaccaccagc agcctgagcg ccagcctggg cgaccgggtg				120
	accatcagct gcagagccag ccaggacatc agcaagtacc tgaactggta ccagcagaag				180
	cccgcaggca ccgtgaagct gctgatctac cacaccagcc ggctgcacag cggcgtgccc				240
	agccgggttca gcggcagcgg cagcggcacc gactacagcc tgaccatcag caacctggag				300
	caggaggaca tcgccacctt cttctgccag cagggcaaca ccttgcccta caccttcgga				360
40	ggcggcacca agctggagat caccaaggcc ggaggcggag gctctggcgg aggcggctct				420
	ggcggaggcg gctctggcgg aggcggcagc gaggtgaagc tgcaggagtc tggcccaggc				480
	ctggtggccc caagccagag cctgagcgtg acctgcaccg tgagcggcgt gagcctgccc				540
	gactacggcg tgagctggat caggcagccc ccacggaagg gcctggagtg gctgggcgtg				600
	atctggggca gcgagaccac ctactacaac agcgccctga agagccggct gaccatcatc				660
45	aaggacaaca gcaagagcca ggtgttcctg aagatgaaca gcctgcagac cgacgacacc				720
	gccatctact actgcgccaa gcaactactac tatggcggca gctacgctat ggactactgg				780
	ggccaggggca ccagcgtgac cgtgagctca gatccacca cgacgccagc gccgcgacca				840
	ccaacaccgg cgcccaccat cgcgtcgcag cccctgtccc tgcgccaga ggcgtgccgg				900

	ccagcggcgg	ggggcgcagt	gcacacgagg	gggctggact	tcgcctgtga	tatcttttgg	960
	gtgctgggtg	tggttgggtg	agtcctggct	tgctatagct	tgctagtaac	agtggccttt	1020
	attattttct	gggtgaggag	agtgaagttc	agcaggagcg	cagacgcccc	cgcgtaggag	1080
	cagggccaga	accagctcta	taacgagctc	aatctaggac	gaagagagga	gtacgatgtt	1140
5	ttggacaaga	gacgtggccg	ggaccctgag	atggggggaa	agccgagaag	gaagaaccct	1200
	caggaaggcc	tgtacaatga	actgcagaaa	gataagatgg	cggaggccta	cagttagatt	1260
	gggatgaaag	gcgagcgccg	gaggggcaag	gggcacgatg	gcctttacca	gggtctcagt	1320
	acagccacca	aggacacctc	cgacgccctt	cacatgcagg	ccctgcctcc	tcgcagagcc	1380
	gagggcaggg	gaagtcttct	aacatgcggg	gacgtggagg	aaaatcccgg	gcccattggag	1440
10	accgacaccc	tgctgctgtg	ggtgctgctg	ctgtgggtgc	caggcagcac	cggccagggtg	1500
	cagctgcagg	agtctggccc	aggcctgggtg	aagcccagcc	agaccctgag	catcacctgc	1560
	accgtgagcg	gcttcagcct	ggccagctac	aacatccact	gggtgcggca	gccccagggc	1620
	aagggcctgg	agtggctggg	cgtgatctgg	gctggcggca	gcaccaacta	caacagcgcc	1680
	ctgatgagcc	ggctgaccat	cagcaaggac	aacagcaaga	accaggtgtt	cctgaagatg	1740
15	agcagcctga	cagccgccga	caccgccgtg	tactactgcg	ccaagcggag	cgacgactac	1800
	agctggttcg	cctactgggg	ccagggcacc	ctggtgaccg	tgagctctgg	cggaggcggc	1860
	tctggcggag	gcggtctctg	cggaggcggc	agcgagaacc	agatgacca	gagccccagc	1920
	agcttgagcg	ccagcgtggg	cgaccgggtg	accatgacct	gcagagccag	cagcagcgtg	1980
	agcagcagct	acctgcactg	gtaccagcag	aagagcggca	aggccccaaa	ggtgtggatc	2040
20	tacagcacca	gcaacctggc	cagcggcgtg	cccagccggt	tcagcggcag	cggcagcggc	2100
	accgactaca	ccctgaccat	cagcagcctg	cagcccagg	acttcgccac	ctactactgc	2160
	cagcagtaca	gcggtctacc	catcaccttc	ggccagggca	ccaaggtgga	gatcaagcgg	2220
	tcggatcccc	ccgagcccaa	atctcctgac	aaaactcaca	catgcccacc	gtgcccagca	2280
	cctcccgtgg	ccggcccgtc	agtcttcctc	ttccccccaa	aacccaagga	caccctcatg	2340
25	atcgcccgga	cccctgaggt	cacatgcgtg	gtggtggacg	tgagccacga	agaccctgag	2400
	gtcaagttca	actggtacgt	ggacggcgtg	gaggtgcata	atgccaagac	aaagccgcgg	2460
	gaggagcagt	acaacagcac	gtaccgtgtg	gtcagcgtcc	tcaccgtcct	gcaccaggac	2520
	tggttgaatg	gcaaggagta	caagtgcagg	gtctccaaca	aagccctccc	agccccatc	2580
	gagaaaacca	tctccaaagc	caaagggcag	ccccgagaac	cacaggtgta	caccctgccc	2640
30	ccatcccggg	atgagctgac	caagaaccag	gtcagcctga	cctgcctggg	caaaggcttc	2700
	tatcccagcg	acatcgccgt	ggagtgggag	agcaatgggc	aaccggagaa	caactacaag	2760
	accacgcctc	ccgtgctgga	ctccgacggc	tccttcttcc	tctacagcaa	gtcaccgtg	2820
	gacaagagca	ggtggcagca	ggggaacgtc	ttctcatgct	ccgtgatgca	tgaggccctg	2880
	cacaatcact	ataccagaa	atctctgagt	ctgagcccag	gcaagaagga	ccccaaaggcg	2940
35	gtttttggct	gtatcttttg	tgccctgggt	attgtgactg	tgggaggcct	catcttctgg	3000
	agaaagaaga	ggaaagatgc	aaagaataat	gaagtgtcct	tttctcaa	ttaaaccctaaa	3060
	aaatctaagt	taatcagagt	ggagaatttt	gaggcctact	tcaagaagca	gcaagctgac	3120
	tccaactgtg	ggttcgcaga	ggaatacgaa	gatctgaagc	ttgttggaat	tagtcaacct	3180
	aaatatgcag	cagaactggc	tgagaataga	ggaaagaatc	gctataataa	tgttctgccc	3240
40	tatgatattt	cccgtgtcaa	actttcggtc	cagaccatt	caacggatga	ctacatcaat	3300
	gccaactaca	tgcttggtc	ccactccaag	aaagatttta	ttgccacaca	aggaccttta	3360
	ccgaacactt	tgaaagattt	ttggcgtatg	gtttgggaga	aaaatgtata	tgccatcatt	3420
	atgttgacta	aatgtgttga	acagggaaga	accaaagtgt	aggagtattg	gccctccaag	3480
	caggctcagg	actatggaga	cataactgtg	gcaatgacat	cagaaattgt	tcttcggaa	3540
45	tggaccatca	gagatttcac	agtgaaaaat	atccagacaa	gtgagagtca	ccctctgaga	3600
	cagttccatt	tcacctcctg	gccagaccac	ggtgttccc	acaccactga	cctgctcatc	3660
	aacttcgggt	acctcgttcg	tgactacatg	aagcagagtc	ctcccgaatc	gccgattctg	3720
	gtgcattgca	gtgctggggg	cggaaggacg	ggcactttca	ttgccattga	tcgtctcatc	3780

taccagatag agaatgagaa caccgtggat gtgtatggga ttgtgtatga ccttcgaatg 3840
cataggcctt taatggtgca gacagaggac cagtatgttt tcctcaatca gtgtgttttg 3900
gatattgtca gatcccagaa agactcaaaa gtagatctta tctaccagaa cacaactgca 3960
atgacaatct atgaaaacct tgcgcccgtg accacatttg gaaagaccaa tggttacatc 4020
5 gcctaa 4026
<210> 43
<211> 1341
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность
10 <220>
<223> Одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv)
SFG.aCD19-CD8STK-CD28tmZ-2A-aCD5-HCH2CH3pvaa-dCD148
<400> 43
Met Ser Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
15 1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu
20 20 25 30
Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln
35 40 45
20 Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr
50 55 60
Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
65 70 75 80
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
25 85 90 95
Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
100 105 110
Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr
115 120 125
30 Lys Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly
145 150 155 160
Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly
35 165 170 175
Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg
180 185 190
Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr
195 200 205
40 Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser
210 215 220
Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr
225 230 235 240
Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala
45 245 250 255
Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Asp Pro
260 265 270
Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala

RU 2717984 C2

		275					280					285						
		Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	
		290					295					300						
5		Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Phe	Trp	
		305					310					315					320	
		Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	
		325					330					335						
	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg		
		340					345					350						
10		Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	
		355					360					365						
		Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	
		370					375					380						
15		Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	
		385					390					395					400	
		Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	
		405					410					415						
	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His		
		420					425					430						
20		Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	
		435					440					445						
		Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	Arg	Ala	Glu	Gly	Arg	Gly	
		450					455					460						
25		Ser	Leu	Leu	Thr	Cys	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Glu	
		465					470					475					480	
		Thr	Asp	Thr	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Pro	Gly	Ser	
		485					490					495						
	Thr	Gly	Gln	Val	Thr	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Ile	Leu	Lys	Pro		
		500					505					510						
30		Ser	Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	
		515					520					525						
		Thr	Ser	Gly	Met	Gly	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Ser	Gly	Lys	Gly	
		530					535					540						
35		Leu	Glu	Trp	Leu	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Val	Tyr	Tyr	Asn	
		545					550					555					560	
		Pro	Ser	Leu	Lys	Asn	Gln	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Ala	Ser	Arg	Asp	
		565					570					575						
	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Ile	Thr	Asn	Leu	Asp	Thr	Ala	Asp	Thr	Ala	Thr		
		580					585					590						
40		Tyr	Tyr	Cys	Val	Arg	Arg	Arg	Ala	Thr	Gly	Thr	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	
		595					600					605						
		Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
		610					615					620						
45		Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asn	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	
		625					630					635					640	
		His	Lys	Phe	Met	Ser	Thr	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Ser	Ile	Ala	Cys	
		645					650					655						
	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Gly	Thr	Ala	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys		

RU 2717984 C2

		660		665		670											
		Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Thr	Ser	Thr	Arg	His
		675						680						685			
		Thr	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
5		690						695						700			
		Thr	Leu	Thr	Ile	Thr	Asn	Val	Gln	Ser	Glu	Asp	Leu	Ala	Asp	Tyr	Phe
		705					710				715					720	
		Cys	His	Gln	Tyr	Asn	Ser	Tyr	Asn	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Arg	Leu
						725					730					735	
10		Glu	Leu	Lys	Arg	Ser	Asp	Pro	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Pro	Asp	Lys	Thr
						740				745					750		
		His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val
						755			760					765			
		Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ala	Arg	Thr
15		770						775						780			
		Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu
		785					790				795					800	
		Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
						805					810					815	
20		Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser
						820				825					830		
		Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
						835			840					845			
		Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
25		850						855						860			
		Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro
		865					870				875					880	
		Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu
						885				890					895		
30		Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
						900				905					910		
		Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
						915			920					925			
		Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
35		930						935						940			
		Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
		945					950				955					960	
		His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Lys
						965				970					975		
40		Asp	Pro	Lys	Ala	Val	Phe	Gly	Cys	Ile	Phe	Gly	Ala	Leu	Val	Ile	Val
						980				985					990		
		Thr	Val	Gly	Gly	Phe	Ile	Phe	Trp	Arg	Lys	Lys	Arg	Lys	Asp	Ala	Lys
						995			1000					1005			
		Asn	Asn	Glu	Val	Ser	Phe	Ser	Gln	Ile	Lys	Pro	Lys	Lys	Ser	Lys	
45		1010						1015					1020				
		Leu	Ile	Arg	Val	Glu	Asn	Phe	Glu	Ala	Tyr	Phe	Lys	Lys	Gln	Gln	
						1025			1030				1035				
		Ala	Asp	Ser	Asn	Cys	Gly	Phe	Ala	Glu	Glu	Tyr	Glu	Asp	Leu	Lys	

RU 2717984 C2

	1040		1045		1050
	Leu Val Gly Ile Ser Gln Pro	Lys Tyr Ala Ala Glu	Leu Ala Glu		
	1055		1060		1065
	Asn Arg Gly Lys Asn Arg Tyr	Asn Asn Val Leu Pro	Tyr Asp Ile		
5	1070		1075		1080
	Ser Arg Val Lys Leu Ser Val	Gln Thr His Ser Thr	Asp Asp Tyr		
	1085		1090		1095
	Ile Asn Ala Asn Tyr Met Pro	Gly Tyr His Ser Lys	Lys Asp Phe		
	1100		1105		1110
10	Ile Ala Thr Gln Gly Pro Leu	Pro Asn Thr Leu Lys	Asp Phe Trp		
	1115		1120		1125
	Arg Met Val Trp Glu Lys Asn	Val Tyr Ala Ile Ile	Met Leu Thr		
	1130		1135		1140
	Lys Cys Val Glu Gln Gly Arg	Thr Lys Cys Glu Glu	Tyr Trp Pro		
15	1145		1150		1155
	Ser Lys Gln Ala Gln Asp Tyr	Gly Asp Ile Thr Val	Ala Met Thr		
	1160		1165		1170
	Ser Glu Ile Val Leu Pro Glu	Trp Thr Ile Arg Asp	Phe Thr Val		
	1175		1180		1185
20	Lys Asn Ile Gln Thr Ser Glu	Ser His Pro Leu Arg	Gln Phe His		
	1190		1195		1200
	Phe Thr Ser Trp Pro Asp His	Gly Val Pro Asp Thr	Thr Asp Leu		
	1205		1210		1215
	Leu Ile Asn Phe Arg Tyr Leu	Val Arg Asp Tyr Met	Lys Gln Ser		
25	1220		1225		1230
	Pro Pro Glu Ser Pro Ile Leu	Val His Cys Ser Ala	Gly Val Gly		
	1235		1240		1245
	Arg Thr Gly Thr Phe Ile Ala	Ile Asp Arg Leu Ile	Tyr Gln Ile		
	1250		1255		1260
30	Glu Asn Glu Asn Thr Val Asp	Val Tyr Gly Ile Val	Tyr Asp Leu		
	1265		1270		1275
	Arg Met His Arg Pro Leu Met	Val Gln Thr Glu Asp	Gln Tyr Val		
	1280		1285		1290
	Phe Leu Asn Gln Cys Val Leu	Asp Ile Val Arg Ser	Gln Lys Asp		
35	1295		1300		1305
	Ser Lys Val Asp Leu Ile Tyr	Gln Asn Thr Thr Ala	Met Thr Ile		
	1310		1315		1320
	Tyr Glu Asn Leu Ala Pro Val	Thr Thr Phe Gly Lys	Thr Asn Gly		
	1325		1330		1335
40	Tyr Ile Ala				
	1340				
	<210>	44			
	<211>	4026			
	<212>	ДНК			
45	<213>	Искусственная последовательность			
	<220>				
	<223>	Одноцепочечный переменный фрагмент (scFv)			
		SFG.aCD19-CD8STK-CD28tmZ-2A-aCD5-HCH2CH3pvaa-dCD148			

<400> 44

	atgagcctgc	ccgtgaccgc	cctgctgctg	cccctggccc	tgctgctgca	cgccgccaga	60
	ccagacatcc	agatgaccga	gaccaccagc	agcctgagcg	ccagcctggg	cgaccgggtg	120
	accatcagct	gcagagccag	ccaggacatc	agcaagtacc	tgaactggta	ccagcagaag	180
5	cccgcaggca	ccgtgaagct	gctgatctac	cacaccagcc	ggctgcacag	cggcgtgccc	240
	agccggttca	gcggcagcgg	cagcggcacc	gactacagcc	tgaccatcag	caacctggag	300
	caggaggaca	tcgccacctc	cttctgccag	cagggcaaca	ccctgcccta	caccttcgga	360
	ggcggcacca	agctggagat	caccaaggcc	ggaggcggag	gctctggcgg	aggcggctct	420
	ggcggaggcg	gctctggcgg	aggcggcagc	gaggtgaagc	tgaggagtc	tggtccaggc	480
10	ctgggtggccc	caagccagag	cctgagcgtg	acctgcaccg	tgagcggcgt	gagcctgccc	540
	gactacggcg	tgagctggat	caggcagccc	ccacggaagg	gcctggagtg	gctgggcgtg	600
	atctggggca	gcgagaccac	ctactacaac	agcgccctga	agagccggct	gaccatcatc	660
	aaggacaaca	gcaagagcca	ggtgttcctg	aagatgaaca	gcctgcagac	cgacgacacc	720
	gccatctact	actgcgcca	gcactactac	tatggcggca	gctacgctat	ggactactgg	780
15	ggccaggggca	ccagcgtgac	cgtgagctca	gatcccacca	cgacgccagc	gccgcgacca	840
	ccaacaccgg	cgccaccat	cgcgctgcag	cccctgtccc	tgcgcccaga	ggcgtgccgg	900
	ccagcggcgg	ggggcgagct	gcacacgagg	gggctggact	tcgcctgtga	tatcttttgg	960
	gtgctggtgg	tggttggtgg	agtccctggc	tgctatagct	tgctagtaac	agtggccttt	1020
	attattttct	gggtgaggag	agtgaagttc	agcaggagcg	cagacgcccc	cggtaccag	1080
20	cagggccaga	accagctcta	taacgagctc	aatctaggac	gaagagagga	gtacgatgtt	1140
	ttggacaaga	gacgtggccg	ggaccctgag	atggggggaa	agccgagaag	gaagaacctt	1200
	caggaaggcc	tgtacaatga	actgcagaaa	gataagatgg	cggaggccta	cagtgaattt	1260
	gggatgaaag	gcgagcgccg	gaggggcaag	gggcacgatg	gcctttacca	gggtctcagt	1320
	acagccacca	aggacacctc	cgacgccctt	cacatgcagg	ccctgcctcc	tcgcagagcc	1380
25	gagggcaggg	gaagtcttct	aacatgcggg	gacgtggagg	aaaatcccgg	gcccattggg	1440
	accgacaccc	tgctgctgtg	ggtgctgctg	ctgtgggtgc	ccggcagcac	cggccagggt	1500
	accctgaagg	agagcgggtc	cggcatcctg	aagcccagcc	agaccctgag	cctgacctgc	1560
	agcttcagcg	gcttcagcct	gagcaccagc	ggcatggggc	tgggctggat	tcggcagccc	1620
	agcggcaagg	gcctggagtg	gctggcccac	atctggtggg	acgacgacgt	gtactacaac	1680
30	cccagcctga	agaaccagct	gaccatcagc	aaggacgcca	gccgggacca	ggtgttcctg	1740
	aagatcacca	acctggacac	cgccgacacc	gccacctact	actgcgtgcg	gcgccggggc	1800
	accggcaccg	gcttcgacta	ctggggccag	ggcaccaccc	tgaccgtgag	cagcgggtgg	1860
	ggtggcagcg	gcggcgggcg	aagcggagg	ggtggcagca	acatcgtgat	gaccagagc	1920
	cacaagttca	tgagcaccag	cgtgggcgac	cgggtgagca	tcgcctgcaa	ggccagccag	1980
35	gacgtgggca	ccgccgtggc	ctggtaccag	cagaagcctg	gccagagccc	caagctgctg	2040
	atctactgga	ccagcaccgg	gcacaccggc	gtgcccagcc	ggttcaccgg	cagcggcagc	2100
	ggcaccgact	tcaccctgac	catcaccaac	gtgcagagcg	aggacctggc	cgactacttc	2160
	tgccaccagt	acaacagcta	caacaccttc	ggcagcggca	cccggctgga	gctgaagcgg	2220
	tcggatcccc	ccgagcccaa	atctcctgac	aaaactcaca	catgcccacc	gtgccagca	2280
40	cctcccgtgg	ccggcccgtc	agtcttcctc	ttcccccaa	aaccaagga	caccctcatg	2340
	atcgcccggg	cccctgaggt	cacatgcgtg	gtggtggacg	tgagccacga	agacctgag	2400
	gtcaagttca	actggtacgt	ggacggcgtg	gaggtgcata	atgccaagac	aaagccgagg	2460
	gaggagcagt	acaacagcac	gtaccgtgtg	gtcagcgtcc	tcaccgtcct	gcaccaggac	2520
	tggtggaatg	gcaaggagta	caagtgcaag	gtctccaaca	aagccctccc	agccccatc	2580
45	gagaaaacca	tctccaaagc	caaagggcag	ccccgagaac	cacaggtgta	caccctgccc	2640
	ccatcccggg	atgagctgac	caagaaccag	gtcagcctga	cctgcctggg	caaaggcttc	2700
	tatcccagcg	acatcgccgt	ggagtgggag	agcaatgggc	aaccggagaa	caactacaag	2760
	accacgcctc	ccgtgctgga	ctccgacggc	tccttcttcc	tctacagcaa	gctcaccgtg	2820

	gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggccctg	2880
	cacaatcact ataccagaa atctctgagt ctgagcccag gcaagaagga cccaaggcg	2940
	gtttttggct gtatctttgg tgccctggtt attgtgactg tgggaggctt catcttctgg	3000
	agaaagaaga ggaaagatgc aaagaataat gaagtgtcct tttctcaaat taaacctaaa	3060
5	aaatctaagt taatcagagt ggagaatttt gaggcctact tcaagaagca gcaagctgac	3120
	tccaactgtg ggttcgcaga ggaatacgaa gatctgaagc ttgttggaat tagtcaacct	3180
	aaatatgcag cagaactggc tgagaataga ggaaagaatc gctataataa tgttctgccc	3240
	tatgatattt cccgtgtcaa actttcggtc cagaccatt caacggatga ctacatcaat	3300
	gccaactaca tgcctggcta ccaactcaaag aaagatttta ttgccacaca aggaccttta	3360
10	ccgaacactt tgaaagattt ttggcgtatg gtttgggaga aaaatgtata tgccatcatt	3420
	atgttgacta aatgtgttga acagggaaga accaaatgtg aggagtattg gccctccaag	3480
	caggctcagg actatggaga cataactgtg gcaatgacat cagaaattgt tcttccggaa	3540
	tggaccatca gagatttcac agtgaaaaat atccagacaa gtgagagtca ccctctgaga	3600
	cagttccatt tcacctcctg gccagaccac ggtgttcccg acaccactga cctgctcatc	3660
15	aacttccggg acctcgttcg tgactacatg aagcagagtc ctcccgaatc gccgattctg	3720
	gtgcattgca gtgctggggg cggaaggacg ggcactttca ttgccattga tcgtctcatc	3780
	taccagatag agaatgagaa caccgtggat gtgtatggga ttgtgtatga ccttcgaatg	3840
	cataggcctt taatggtgca gacagaggac cagtatgttt tcctcaatca gtgtgttttg	3900
	gatattgtca gatcccagaa agactcaaaa gtagatctta tctaccagaa cacaactgca	3960
20	atgacaatct atgaaaacct tgcgcccgtg accacatttg gaaagaccaa tggttacatc	4020
	gcctaa	4026
	<210> 45	
	<211> 1342	
	<212> Белок	
25	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv)	
	SFG.aCD19-CD8STK-CD28tmZ-2A-aEGFRvIII-HCH2CH3pvaa-dCD148	
	<400> 45	
30	Met Ser Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu	
	1 5 10 15	
	His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu	
	20 25 30	
	Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln	
35	35 40 45	
	Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr	
	50 55 60	
	Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro	
	65 70 75 80	
40	Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile	
	85 90 95	
	Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly	
	100 105 110	
	Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr	
45	115 120 125	
	Lys Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly	
	130 135 140	
	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly	

RU 2717984 C2

	145		150		155		160									
	Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly
					165					170					175	
	Val	Ser	Leu	Pro	Asp	Tyr	Gly	Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Arg
5				180					185					190		
	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Tyr
				195				200					205			
	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ile	Lys	Asp	Asn	Ser
				210				215					220			
10	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Thr	Asp	Asp	Thr
	225				230						235				240	
	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala
				245						250					255	
	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Asp	Pro
15				260					265					270		
	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala
				275					280					285		
	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly
				290				295				300				
20	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Phe	Trp
	305					310					315					320
	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val
				325						330					335	
	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg
25				340					345					350		
	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn
				355				360					365			
	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg
				370			375				380					
30	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro
	385					390					395					400
	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala
				405						410				415		
	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His
35				420					425					430		
	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp
				435				440					445			
	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	Arg	Ala	Glu	Gly	Arg	Gly
				450			455					460				
40	Ser	Leu	Leu	Thr	Cys	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Glu
	465					470					475					480
	Thr	Asp	Thr	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Pro	Gly	Ser
				485						490					495	
	Thr	Gly	Gln	Val	Lys	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro
45				500					505					510		
	Gly	Ala	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Val	Thr	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Arg
				515				520					525			
	Lys	Phe	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Ser	Asp	Lys	Arg	Leu	Glu

RU 2717984 C2

	530		535		540											
	Trp	Val	Ala	Ser	Ile	Ser	Thr	Gly	Gly	Tyr	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Ser	Asp
	545					550					555					560
	Asn	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Glu	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr
5					565					570						575
	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr
				580					585					590		
	Tyr	Cys	Thr	Arg	Gly	Tyr	Ser	Ser	Thr	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp
			595					600					605			
10	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
	610					615					620					
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Ser
	625				630					635						640
	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Val	Ala	Thr	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Ile	Arg	Cys
15				645					650						655	
	Met	Thr	Ser	Thr	Asp	Ile	Asp	Asp	Asp	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys
			660					665					670			
	Pro	Gly	Glu	Pro	Pro	Lys	Phe	Leu	Ile	Ser	Glu	Gly	Asn	Thr	Leu	Arg
		675				680					685					
20	Pro	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Ser	Ser	Gly	Thr	Gly	Thr	Asp	Phe
	690					695					700					
	Val	Phe	Thr	Ile	Glu	Asn	Thr	Leu	Ser	Glu	Asp	Val	Gly	Asp	Tyr	Tyr
	705				710					715						720
	Cys	Leu	Gln	Ser	Phe	Asn	Val	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Asp	Gly	Thr	Lys
25				725					730						735	
	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ser	Asp	Pro	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Pro	Asp	Lys
		740					745						750			
	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser
		755					760					765				
30	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ala	Arg
	770					775					780					
	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
	785				790				795							800
	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
35				805					810						815	
	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
		820					825					830				
	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
		835				840						845				
40	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
	850					855					860					
	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
	865				870				875							880
	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
45				885					890						895	
	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
		900					905					910				
	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp

RU 2717984 C2

	915		920		925	
	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser					
	930		935		940	
	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala					
5	945		950		955	960
	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys					
		965		970		975
	Lys Asp Pro Lys Ala Val Phe Gly Cys Ile Phe Gly Ala Leu Val Ile					
		980		985		990
10	Val Thr Val Gly Gly Phe Ile Phe Trp Arg Lys Lys Arg Lys Asp Ala					
		995		1000		1005
	Lys Asn Asn Glu Val Ser Phe Ser Gln Ile Lys Pro Lys Lys Ser					
		1010		1015		1020
	Lys Leu Ile Arg Val Glu Asn Phe Glu Ala Tyr Phe Lys Lys Gln					
15	1025		1030		1035	
	Gln Ala Asp Ser Asn Cys Gly Phe Ala Glu Glu Tyr Glu Asp Leu					
		1040		1045		1050
	Lys Leu Val Gly Ile Ser Gln Pro Lys Tyr Ala Ala Glu Leu Ala					
		1055		1060		1065
20	Glu Asn Arg Gly Lys Asn Arg Tyr Asn Asn Val Leu Pro Tyr Asp					
		1070		1075		1080
	Ile Ser Arg Val Lys Leu Ser Val Gln Thr His Ser Thr Asp Asp					
		1085		1090		1095
	Tyr Ile Asn Ala Asn Tyr Met Pro Gly Tyr His Ser Lys Lys Asp					
25	1100		1105		1110	
	Phe Ile Ala Thr Gln Gly Pro Leu Pro Asn Thr Leu Lys Asp Phe					
		1115		1120		1125
	Trp Arg Met Val Trp Glu Lys Asn Val Tyr Ala Ile Ile Met Leu					
		1130		1135		1140
30	Thr Lys Cys Val Glu Gln Gly Arg Thr Lys Cys Glu Glu Tyr Trp					
		1145		1150		1155
	Pro Ser Lys Gln Ala Gln Asp Tyr Gly Asp Ile Thr Val Ala Met					
		1160		1165		1170
	Thr Ser Glu Ile Val Leu Pro Glu Trp Thr Ile Arg Asp Phe Thr					
35	1175		1180		1185	
	Val Lys Asn Ile Gln Thr Ser Glu Ser His Pro Leu Arg Gln Phe					
		1190		1195		1200
	His Phe Thr Ser Trp Pro Asp His Gly Val Pro Asp Thr Thr Asp					
		1205		1210		1215
40	Leu Leu Ile Asn Phe Arg Tyr Leu Val Arg Asp Tyr Met Lys Gln					
		1220		1225		1230
	Ser Pro Pro Glu Ser Pro Ile Leu Val His Cys Ser Ala Gly Val					
		1235		1240		1245
	Gly Arg Thr Gly Thr Phe Ile Ala Ile Asp Arg Leu Ile Tyr Gln					
45	1250		1255		1260	
	Ile Glu Asn Glu Asn Thr Val Asp Val Tyr Gly Ile Val Tyr Asp					
		1265		1270		1275
	Leu Arg Met His Arg Pro Leu Met Val Gln Thr Glu Asp Gln Tyr					

	1280		1285		1290	
	Val Phe Leu Asn Gln Cys Val Leu Asp Ile Val Arg Ser Gln Lys					
	1295		1300		1305	
	Asp Ser Lys Val Asp Leu Ile Tyr Gln Asn Thr Thr Ala Met Thr					
5	1310		1315		1320	
	Ile Tyr Glu Asn Leu Ala Pro Val Thr Thr Phe Gly Lys Thr Asn					
	1325		1330		1335	
	Gly Tyr Ile Ala					
	1340					
10	<210> 46					
	<211> 4029					
	<212> ДНК					
	<213> Искусственная последовательность					
	<220>					
15	<223> Одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv)					
	SFG.aCD19-CD8STK-CD28tmZ-2A-aEGFRvIII-HCH2CH3pvaa-dCD148					
	<400> 46					
	atgagcctgc ccgtgaccgc cctgctgctg cccctggccc tgctgctgca cgccgccaga					60
	ccagacatcc agatgaccga gaccaccagc agcctgagcg ccagcctggg cgaccgggtg					120
20	accatcagct gcagagccag ccaggacatc agcaagtacc tgaactggta ccagcagaag					180
	cccgcaggca ccgtgaagct gctgatctac cacaccagcc ggctgcacag cggcgtgccc					240
	agccgggttca gcggcagcgg cagcggcacc gactacagcc tgaccatcag caacctggag					300
	caggaggaca tcgccacctt cttctgccag cagggcaaca ccctgcccta caccttcgga					360
	ggcgggacca agctggagat caccaaggcc ggaggcggag gctctggcgg aggcggctct					420
25	ggcggaggcg gctctggcgg aggcggcagc gaggtgaagc tgcaggagtc tggcccaggc					480
	ctggtggccc caagccagag cctgagcgtg acctgcaccg tgagcggcgt gagcctgccc					540
	gactacggcg tgagctggat caggcagccc ccacggaagg gcctggagtg gctgggcgtg					600
	atctggggca gcgagaccac ctactacaac agcgccctga agagccggct gaccatcatc					660
	aaggacaaca gcaagagcca ggtgttcctg aagatgaaca gcctgcagac cgacgacacc					720
30	gccatctact actgcgcca gcaactactac tatggcggca gctacgctat ggactactgg					780
	ggccagggca ccagcgtgac cgtgagctca gatcccacca cgacgccagc gccgcgacca					840
	ccaacaccgg cgcccaccat cgcgtcgag cccctgtccc tgcgcccaga ggctgcccgg					900
	ccagcggcgg ggggcgcagt gcacacgagg gggctggact tcgcctgtga tatcttttgg					960
	gtgctggtgg tggttggtgg agtcctggct tgctatagct tgctagtaac agtggccttt					1020
35	attatcttct ggggtgaggag agtgaagtgc agcaggagcg cagacgcccc cgcgtaccag					1080
	cagggccaga accagctcta taacgagctc aatctaggac gaagagagga gtacgatgtt					1140
	ttggacaaga gacgtggccg ggaccctgag atggggggaa agccgagaag gaagaaccct					1200
	caggaaggcc tgtacaatga actgcagaaa gataagatgg cggaggccta cagtgaattt					1260
	gggatgaaag gcgagcgccg gaggggcaag gggcacgatg gcctttacca gggctctcagt					1320
40	acagccacca aggacacctt cgacgccctt cacatgcagg ccctgcctcc tcgcagagcc					1380
	gagggcaggg gaagtcttct aacatgcggg gacgtggagg aaaatcccgg gcccatggag					1440
	accgacaccc tgctgctgtg ggtgctgctg ctgtgggtgc ccggcagcac cggccagggtg					1500
	aagctgcagc agagcggcgg aggcctgggtg aagcccggcg ccagcctgaa gctgagctgc					1560
	gtgaccagcg gcttcacctt ccggaagtgc ggcatgagct ggggtgcggca gaccagcgac					1620
45	aagcggctgg agtgggtggc cagcatcagc accggcgggt acaacacctt ctacagcgac					1680
	aacgtgaagg gccgggttac catcagccgg gagaacgcca agaaccacct gtacctgcag					1740
	atgagcagcc tgaagagcga ggacaccgcc ctgtactact gcacccgggg ctacagcagc					1800
	accagctacg ctatggacta ctggggccag ggcaccaccg tgacagttag cagcggcgga					1860

	ggaggcagtg	gtgggggtgg	atctggcgga	ggtggcagcg	acatcgagct	gacccagagc	1920
	cccgccagcc	tgagcgtggc	caccggcgag	aagggtgacca	tccggtgcat	gaccagcacc	1980
	gacatcgacg	acgacatgaa	ctggtaccag	cagaagcccc	gcgagccccc	aaagttcctg	2040
	atcagcgagg	gcaacaccct	gcggccccggc	gtgccagacc	ggttcagcag	cagcggcacc	2100
5	ggcaccgact	tcgtgttcac	catcgagaac	accctgagcg	aggacgtggg	cgactactac	2160
	tgccctgcaga	gcttcaacgt	gcccctgacc	ttcggcgacg	gcaccaagct	ggagatcaag	2220
	cggtcggatc	ccgccgagcc	caaatctcct	gacaaaactc	acacatgccc	accgtgcccc	2280
	gcacctcccc	tggccggccc	gtcagttctt	ctcttccccc	caaaacccaa	ggacaccctc	2340
	atgatcgccc	ggacccctga	ggtcacatgc	gtggtggtgg	acgtgagcca	cgaagaccct	2400
10	gaggtcaagt	tcaactggta	cgtggacggc	gtggaggtgc	ataatgccaa	gacaaagccg	2460
	cgggaggagc	agtacaacag	cacgtaccgt	gtggtcagcg	tcctcacctg	cctgcaccag	2520
	gactggctga	atggcaagga	gtacaagtgc	aagggtctcca	acaaagccct	cccagccccc	2580
	atcgagaaaa	ccatctccaa	agccaaaggg	cagccccgag	aaccacaggt	gtacaccctg	2640
	cccccatccc	gggatgagct	gaccaagaac	caggtcagcc	tgacctgcct	ggtcaaaggc	2700
15	ttctatccca	gcgacatcgc	cgtggagtgg	gagagcaatg	ggcaaccgga	gaacaactac	2760
	aagaccacgc	ctcccgtgct	ggactccgac	ggctccttct	tcctctacag	caagctcacc	2820
	gtggacaaga	gcaggtggca	gcaggggaac	gtcttctcat	gctccgtgat	gcatgaggcc	2880
	ctgcacaatc	actataccca	gaaatctctg	agtctgagcc	caggcaagaa	ggacccaag	2940
	gcggtttttg	gctgtatctt	tggtgccctg	gttattgtga	ctgtgggagg	cttcatcttc	3000
20	tggagaaaga	agaggaaaga	tgcaaagaat	aatgaagtgt	ccttttctca	aattaaacct	3060
	aaaaaatcta	agttaatcag	agtggagaat	tttgaggcct	acttcaagaa	gcagcaagct	3120
	gactccaact	gtgggttcgc	agaggaatac	gaagatctga	agcttggttg	aattagtcaa	3180
	cctaaatatg	cagcagaact	ggctgagaat	agaggaaaga	atcgctataa	taatgttctg	3240
	ccctatgata	tttcccgtgt	caaactttcg	gtccagaccc	attcaacgga	tgactacatc	3300
25	aatgccaact	acatgcctgg	ctaccactcc	aagaaaagatt	ttattgccac	acaaggacct	3360
	ttaccgaaca	ctttgaaaga	tttttgcgct	atggtttggg	agaaaaatgt	atatgccatc	3420
	attatgttga	ctaaatgtgt	tgaacaggga	agaaccaa	gtgaggagta	ttggccctcc	3480
	aagcaggctc	aggactatgg	agacataact	gtggcaatga	catcagaaat	tggtcttccg	3540
	gaatggacca	tcagagatgt	cacagtga	aatatccaga	caagtgagag	tcaccctctg	3600
30	agacagttcc	atttcacctc	ctggccagac	cacggtgttc	ccgacaccac	tgacctgctc	3660
	atcaacttcc	ggtacctcgt	tcgtgactac	atgaagcaga	gtcctcccga	atcgccgatt	3720
	ctggtgcatt	gcagtgctgg	ggtcggaagg	acgggcactt	tcattgccat	tgatcgtctc	3780
	atctaccaga	tagagaatga	gaacaccgtg	gatgtgtatg	ggattgtgta	tgaccttcga	3840
	atgcataggc	ctttaatggg	gcagacagag	gaccagtatg	ttttcctcaa	tcagtgtgtt	3900
35	ttggatattg	tcagatccca	gaaagactca	aaagtagatc	ttatctacca	gaacacaact	3960
	gcaatgacaa	tctatgaaaa	ccttgcgccc	gtgaccacat	ttggaaagac	caatggttac	4020
	atcgccctaa						4029
	<210>	47					
	<211>	6					
40	<212>	Белок					
	<213>	Искусственная последовательность					
	<220>						
	<223>	Иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM)					
	<220>						
45	<221>	смешанные свойства					
	<222>	(1)..(1)					
	<223>	Хаа может представлять собой Ser, Ile, Val или Leu					
	<220>						

<221> смешанные свойства
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа может представлять собой любую встречающуюся в природе аминокислоту
 <220>
 5 <221> смешанные свойства
 <222> (4)..(5)
 <223> Хаа может представлять собой любую встречающуюся в природе аминокислоту
 <220>
 <221> смешанные свойства
 10 <222> (6)..(6)
 <223> Хаа может представлять собой Ile, Val или Leu
 <400> 47
 Хаа Хаа Tyr Хаа Хаа Хаа
 1 5
 15 <210> 48
 <211> 1114
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 20 <223> Аминокислотная последовательность логического элемента И HE
 (16076.SFG.aCD19fmc63-CD8STK-CD28tmZ-2A-aCD33glx-muCD8STK-tm-dPTP
 N6)
 <400> 48
 Met Ser Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 25 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu
 20 25 30
 Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 35 40 45
 30 Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr
 50 55 60
 Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
 35 85 90 95
 Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
 100 105 110
 Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr
 115 120 125
 40 Lys Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly
 145 150 155 160
 Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly
 45 165 170 175
 Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg
 180 185 190
 Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr

RU 2717984 C2

	195		200		205
	Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser				
	210		215		220
5	Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr				
	225		230		235
	Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala				
		245		250	255
	Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Asp Pro				
		260		265	270
10	Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala				
		275		280	285
	Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly				
		290		295	300
15	Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Phe Trp				
	305		310		315
	Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val				
		325		330	335
	Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Arg Val Lys Phe Ser Arg				
		340		345	350
20	Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn				
		355		360	365
	Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg				
		370		375	380
25	Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro				
	385		390		395
	Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala				
		405		410	415
	Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His				
		420		425	430
30	Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp				
		435		440	445
	Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Arg Ala Glu Gly Arg Gly				
		450		455	460
35	Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala				
	465		470		475
	Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr Asp Ala				
		485		490	495
	Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser				
		500		505	510
40	Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr				
		515		520	525
	Phe Asn Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu				
		530		535	540
45	Leu Ile Tyr Asp Thr Asn Arg Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe				
	545		550		555
	Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu				
		565		570	575
	Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Lys Asn Tyr				

RU 2717984 C2

		580		585		590											
		Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ser	Gly
		595							600					605			
5		Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
		610						615					620				
		Gly	Gly	Ser	Arg	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu
		625					630					635				640	
		Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe
					645						650				655		
10		Thr	Leu	Ser	Asn	Tyr	Gly	Met	His	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys
					660					665					670		
		Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ser	Ile	Ser	Leu	Asn	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr
				675					680				685				
		Tyr	Arg	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala
15				690				695					700				
		Lys	Ser	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr
		705					710					715				720	
		Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Gln	Asp	Ala	Tyr	Thr	Gly	Gly	Tyr	Phe
					725						730				735		
20		Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Met	Asp	Pro
					740					745					750		
		Ala	Thr	Thr	Thr	Lys	Pro	Val	Leu	Arg	Thr	Pro	Ser	Pro	Val	His	Pro
				755					760						765		
		Thr	Gly	Thr	Ser	Gln	Pro	Gln	Arg	Pro	Glu	Asp	Cys	Arg	Pro	Arg	Gly
25				770				775					780				
		Ser	Val	Lys	Gly	Thr	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Trp	Ala
		785					790					795				800	
		Pro	Leu	Ala	Gly	Ile	Cys	Val	Ala	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Ile	Ile	Thr
					805						810				815		
30		Leu	Ile	Cys	Tyr	His	Arg	Ser	Arg	Lys	Arg	Val	Cys	Lys	Ser	Gly	Gly
					820					825					830		
		Gly	Ser	Phe	Trp	Glu	Glu	Phe	Glu	Ser	Leu	Gln	Lys	Gln	Glu	Val	Lys
				835					840					845			
		Asn	Leu	His	Gln	Arg	Leu	Glu	Gly	Gln	Arg	Pro	Glu	Asn	Lys	Gly	Lys
35				850				855					860				
		Asn	Arg	Tyr	Lys	Asn	Ile	Leu	Pro	Phe	Asp	His	Ser	Arg	Val	Ile	Leu
		865					870				875				880		
		Gln	Gly	Arg	Asp	Ser	Asn	Ile	Pro	Gly	Ser	Asp	Tyr	Ile	Asn	Ala	Asn
					885					890					895		
40		Tyr	Ile	Lys	Asn	Gln	Leu	Leu	Gly	Pro	Asp	Glu	Asn	Ala	Lys	Thr	Tyr
				900					905						910		
		Ile	Ala	Ser	Gln	Gly	Cys	Leu	Glu	Ala	Thr	Val	Asn	Asp	Phe	Trp	Gln
				915					920					925			
		Met	Ala	Trp	Gln	Glu	Asn	Ser	Arg	Val	Ile	Val	Met	Thr	Thr	Arg	Glu
45				930				935					940				
		Val	Glu	Lys	Gly	Arg	Asn	Lys	Cys	Val	Pro	Tyr	Trp	Pro	Glu	Val	Gly
		945					950				955				960		
		Met	Gln	Arg	Ala	Tyr	Gly	Pro	Tyr	Ser	Val	Thr	Asn	Cys	Gly	Glu	His

		965		970		975										
	Asp	Thr	Thr	Glu	Tyr	Lys	Leu	Arg	Thr	Leu	Gln	Val	Ser	Pro	Leu	Asp
				980				985					990			
	Asn	Gly	Asp	Leu	Ile	Arg	Glu	Ile	Trp	His	Tyr	Gln	Tyr	Leu	Ser	Trp
5			995				1000						1005			
	Pro	Asp	His	Gly	Val	Pro	Ser	Glu	Pro	Gly	Gly	Val	Leu	Ser	Phe	
		1010					1015					1020				
	Leu	Asp	Gln	Ile	Asn	Gln	Arg	Gln	Glu	Ser	Leu	Pro	His	Ala	Gly	
		1025					1030					1035				
10	Pro	Ile	Ile	Val	His	Cys	Ser	Ala	Gly	Ile	Gly	Arg	Thr	Gly	Thr	
		1040					1045					1050				
	Ile	Ile	Val	Ile	Asp	Met	Leu	Met	Glu	Asn	Ile	Ser	Thr	Lys	Gly	
		1055					1060					1065				
	Leu	Asp	Cys	Asp	Ile	Asp	Ile	Gln	Lys	Thr	Ile	Gln	Met	Val	Arg	
15		1070					1075					1080				
	Ala	Gln	Arg	Ser	Gly	Met	Val	Gln	Thr	Glu	Ala	Gln	Tyr	Lys	Phe	
		1085					1090					1095				
	Ile	Tyr	Val	Ala	Ile	Ala	Gln	Phe	Ile	Glu	Thr	Thr	Lys	Lys	Lys	
		1100					1105					1110				
20	Leu															
	<210>	49														
	<211>	918														
	<212>	Белок														
	<213>	Искусственная последовательность														
25	<220>															
	<223>	Аминокислотная последовательность логического элемента И HE														
		(MP16091.SFG.aCD19fmc63-CD8STK-CD28tmZ-2A-aCD33glx-muCD8STK-LAIR1														
		tm-endo)														
	<400>	49														
30	Met	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu
	1				5					10				15		
	His	Ala	Ala	Arg	Pro	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Ser	Leu
				20					25				30			
	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln
35			35				40					45				
	Asp	Ile	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr
		50					55					60				
	Val	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	His	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro
	65				70					75				80		
40	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile
				85					90				95			
	Ser	Asn	Leu	Glu	Gln	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly
			100						105				110			
	Asn	Thr	Leu	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Thr
45			115					120					125			
	Lys	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
		130					135					140				
	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly

RU 2717984 C2

	145		150		155		160									
	Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly
				165					170						175	
	Val	Ser	Leu	Pro	Asp	Tyr	Gly	Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Arg
5			180						185					190		
	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Tyr
			195					200					205			
	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ile	Lys	Asp	Asn	Ser
			210					215					220			
10	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Thr	Asp	Asp	Thr
			225					230					235			240
	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala
				245						250					255	
	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Asp	Pro
15			260						265					270		
	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala
			275						280					285		
	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly
			290					295					300			
20	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Phe	Trp
			305					310					315			320
	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val
				325						330					335	
	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg
25			340						345					350		
	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn
			355						360					365		
	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg
			370					375					380			
30	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro
			385					390					395			400
	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala
				405						410					415	
	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His
35			420						425					430		
	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp
			435					440					445			
	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	Arg	Ala	Glu	Gly	Arg	Gly
			450					455					460			
40	Ser	Leu	Leu	Thr	Cys	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Ala
			465					470					475			480
	Val	Pro	Thr	Gln	Val	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Thr	Asp	Ala
				485						490					495	
	Arg	Cys	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser
45			500						505					510		
	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asp	Ile	Tyr
			515						520					525		
	Phe	Asn	Leu	Val	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu

RU 2717984 C2

	530		535		540												
	Leu	Ile	Tyr	Asp	Thr	Asn	Arg	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	
	545					550					555					560	
5	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	
					565					570					575		
	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Tyr	Lys	Asn	Tyr	
				580					585				590				
	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ser	Gly	
			595					600					605				
10	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
	610					615					620						
	Gly	Gly	Ser	Arg	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	
	625					630					635					640	
	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	
15				645						650					655		
	Thr	Leu	Ser	Asn	Tyr	Gly	Met	His	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	
				660					665					670			
	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ser	Ile	Ser	Leu	Asn	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	
			675					680				685					
20	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	
	690						695					700					
	Lys	Ser	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	
	705					710					715					720	
	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Gln	Asp	Ala	Tyr	Thr	Gly	Gly	Tyr	Phe	
25				725						730					735		
	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Met	Asp	Pro	
				740					745					750			
	Ala	Thr	Thr	Thr	Lys	Pro	Val	Leu	Arg	Thr	Pro	Ser	Pro	Val	His	Pro	
			755					760					765				
30	Thr	Gly	Thr	Ser	Gln	Pro	Gln	Arg	Pro	Glu	Asp	Cys	Arg	Pro	Arg	Gly	
	770					775						780					
	Ser	Val	Lys	Gly	Thr	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Leu	Ile	Gly	
	785					790					795					800	
	Val	Ser	Val	Val	Phe	Leu	Phe	Cys	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Phe	Cys	
35				805						810					815		
	Leu	His	Arg	Gln	Asn	Gln	Ile	Lys	Gln	Gly	Pro	Pro	Arg	Ser	Lys	Asp	
				820					825					830			
	Glu	Glu	Gln	Lys	Pro	Gln	Gln	Arg	Pro	Asp	Leu	Ala	Val	Asp	Val	Leu	
			835					840					845				
40	Glu	Arg	Thr	Ala	Asp	Lys	Ala	Thr	Val	Asn	Gly	Leu	Pro	Glu	Lys	Asp	
	850						855					860					
	Arg	Glu	Thr	Asp	Thr	Ser	Ala	Leu	Ala	Ala	Gly	Ser	Ser	Gln	Glu	Val	
	865					870					875					880	
	Thr	Tyr	Ala	Gln	Leu	Asp	His	Trp	Ala	Leu	Thr	Gln	Arg	Thr	Ala	Arg	
45				885						890					895		
	Ala	Val	Ser	Pro	Gln	Ser	Thr	Lys	Pro	Met	Ala	Glu	Ser	Ile	Thr	Tyr	
				900					905					910			
	Ala	Ala	Val	Ala	Arg	His											

915
 <210> 50
 <211> 1362
 <212> Белок
 5 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность логического элемента И HE
 (MP16092.SFG.aCD19fmc63-CD8STK-CD28tmZ-2A-aCD33glx-muCD8STK-LAIR1
 tm-endo-2A-PTPN6_SH2-dCD148)
 10 <400> 50
 Met Ser Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu
 20 25 30
 15 Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 35 40 45
 Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr
 50 55 60
 Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
 20 65 70 75 80
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
 85 90 95
 Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
 100 105 110
 25 Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr
 115 120 125
 Lys Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly
 30 145 150 155 160
 Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly
 165 170 175
 Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg
 180 185 190
 35 Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr
 195 200 205
 Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser
 210 215 220
 Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr
 40 225 230 235 240
 Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala
 245 250 255
 Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Asp Pro
 260 265 270
 45 Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
 275 280 285
 Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
 290 295 300

RU 2717984 C2

	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Phe	Trp
	305					310					315					320
	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val
					325					330					335	
5	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg
				340					345					350		
	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn
			355					360					365			
	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg
10		370					375					380				
	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro
	385					390					395					400
	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala
				405						410					415	
15	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His
				420					425					430		
	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp
			435					440					445			
	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	Arg	Ala	Glu	Gly	Arg	Gly
20		450					455					460				
	Ser	Leu	Leu	Thr	Cys	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Ala
	465					470					475					480
	Val	Pro	Thr	Gln	Val	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Thr	Asp	Ala
				485					490						495	
25	Arg	Cys	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser
				500					505					510		
	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asp	Ile	Tyr
		515						520					525			
	Phe	Asn	Leu	Val	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu
30		530					535					540				
	Leu	Ile	Tyr	Asp	Thr	Asn	Arg	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe
	545					550					555					560
	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu
				565					570					575		
35	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Tyr	Lys	Asn	Tyr
				580					585					590		
	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ser	Gly
		595						600					605			
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
40		610					615					620				
	Gly	Gly	Ser	Arg	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu
	625					630					635					640
	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe
				645					650					655		
45	Thr	Leu	Ser	Asn	Tyr	Gly	Met	His	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys
				660					665					670		
	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ser	Ile	Ser	Leu	Asn	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr
		675						680					685			

RU 2717984 C2

	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	
	690						695					700					
	Lys	Ser	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	
	705						710					715					720
5	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Gln	Asp	Ala	Tyr	Thr	Gly	Gly	Tyr	Phe	
							725					730					735
	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Met	Asp	Pro	
							740					745					750
	Thr	Thr	Thr	Lys	Pro	Val	Leu	Arg	Thr	Pro	Ser	Pro	Val	His	Pro	Thr	
10							755					760					765
	Gly	Thr	Ser	Gln	Pro	Gln	Arg	Pro	Glu	Asp	Cys	Arg	Pro	Arg	Gly	Ser	
	770						775					780					
	Val	Lys	Gly	Thr	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Leu	Ile	Gly	Val	
	785						790					795					800
15	Ser	Val	Val	Phe	Leu	Phe	Cys	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Phe	Cys	Leu	
							805					810					815
	His	Arg	Gln	Asn	Gln	Ile	Lys	Gln	Gly	Pro	Pro	Arg	Ser	Lys	Asp	Glu	
							820					825					830
	Glu	Gln	Lys	Pro	Gln	Gln	Arg	Pro	Asp	Leu	Ala	Val	Asp	Val	Leu	Glu	
20							835					840					845
	Arg	Thr	Ala	Asp	Lys	Ala	Thr	Val	Asn	Gly	Leu	Pro	Glu	Lys	Asp	Arg	
	850						855					860					
	Glu	Thr	Asp	Thr	Ser	Ala	Leu	Ala	Ala	Gly	Ser	Ser	Gln	Glu	Val	Thr	
	865						870					875					880
25	Tyr	Ala	Gln	Leu	Asp	His	Trp	Ala	Leu	Thr	Gln	Arg	Thr	Ala	Arg	Ala	
							885					890					895
	Val	Ser	Pro	Gln	Ser	Thr	Lys	Pro	Met	Ala	Glu	Ser	Ile	Thr	Tyr	Ala	
							900					905					910
	Ala	Val	Ala	Arg	His	Arg	Ala	Glu	Gly	Arg	Gly	Ser	Leu	Leu	Thr	Cys	
30							915					920					925
	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Trp	Tyr	His	Gly	His	Met	Ser	
	930						935					940					
	Gly	Gly	Gln	Ala	Glu	Thr	Leu	Leu	Gln	Ala	Lys	Gly	Glu	Pro	Trp	Thr	
	945						950					955					960
35	Phe	Leu	Val	Arg	Glu	Ser	Leu	Ser	Gln	Pro	Gly	Asp	Phe	Val	Leu	Ser	
							965					970					975
	Val	Leu	Ser	Asp	Gln	Pro	Lys	Ala	Gly	Pro	Gly	Ser	Pro	Leu	Arg	Val	
							980					985					990
	Thr	His	Ile	Lys	Val	Met	Cys	Glu	Gly	Gly	Arg	Tyr	Thr	Val	Gly	Gly	
40							995					1000					1005
	Leu	Glu	Thr	Phe	Asp	Ser	Leu	Thr	Asp	Leu	Val	Glu	His	Phe	Lys		
	1010						1015					1020					
	Lys	Thr	Gly	Ile	Glu	Glu	Ala	Ser	Gly	Ala	Phe	Val	Tyr	Leu	Arg		
	1025						1030					1035					
45	Gln	Pro	Tyr	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Phe	Glu	Ala	Tyr	Phe	Lys		
	1040						1045					1050					
	Lys	Gln	Gln	Ala	Asp	Ser	Asn	Cys	Gly	Phe	Ala	Glu	Glu	Tyr	Glu		
	1055						1060					1065					

RU 2717984 C2

	Asp	Leu	Lys	Leu	Val	Gly	Ile	Ser	Gln	Pro	Lys	Tyr	Ala	Ala	Glu
	1070						1075					1080			
	Leu	Ala	Glu	Asn	Arg	Gly	Lys	Asn	Arg	Tyr	Asn	Asn	Val	Leu	Pro
	1085						1090					1095			
5	Tyr	Asp	Ile	Ser	Arg	Val	Lys	Leu	Ser	Val	Gln	Thr	His	Ser	Thr
	1100						1105					1110			
	Asp	Asp	Tyr	Ile	Asn	Ala	Asn	Tyr	Met	Pro	Gly	Tyr	His	Ser	Lys
	1115						1120					1125			
	Lys	Asp	Phe	Ile	Ala	Thr	Gln	Gly	Pro	Leu	Pro	Asn	Thr	Leu	Lys
10	1130						1135					1140			
	Asp	Phe	Trp	Arg	Met	Val	Trp	Glu	Lys	Asn	Val	Tyr	Ala	Ile	Ile
	1145						1150					1155			
	Met	Leu	Thr	Lys	Cys	Val	Glu	Gln	Gly	Arg	Thr	Lys	Cys	Glu	Glu
	1160						1165					1170			
15	Tyr	Trp	Pro	Ser	Lys	Gln	Ala	Gln	Asp	Tyr	Gly	Asp	Ile	Thr	Val
	1175						1180					1185			
	Ala	Met	Thr	Ser	Glu	Ile	Val	Leu	Pro	Glu	Trp	Thr	Ile	Arg	Asp
	1190						1195					1200			
	Phe	Thr	Val	Lys	Asn	Ile	Gln	Thr	Ser	Glu	Ser	His	Pro	Leu	Arg
20	1205						1210					1215			
	Gln	Phe	His	Phe	Thr	Ser	Trp	Pro	Asp	His	Gly	Val	Pro	Asp	Thr
	1220						1225					1230			
	Thr	Asp	Leu	Leu	Ile	Asn	Phe	Arg	Tyr	Leu	Val	Arg	Asp	Tyr	Met
	1235						1240					1245			
25	Lys	Gln	Ser	Pro	Pro	Glu	Ser	Pro	Ile	Leu	Val	His	Cys	Ser	Ala
	1250						1255					1260			
	Gly	Val	Gly	Arg	Thr	Gly	Thr	Phe	Ile	Ala	Ile	Asp	Arg	Leu	Ile
	1265						1270					1275			
	Tyr	Gln	Ile	Glu	Asn	Glu	Asn	Thr	Val	Asp	Val	Tyr	Gly	Ile	Val
30	1280						1285					1290			
	Tyr	Asp	Leu	Arg	Met	His	Arg	Pro	Leu	Met	Val	Gln	Thr	Glu	Asp
	1295						1300					1305			
	Gln	Tyr	Val	Phe	Leu	Asn	Gln	Cys	Val	Leu	Asp	Ile	Val	Arg	Ser
	1310						1315					1320			
35	Gln	Lys	Asp	Ser	Lys	Val	Asp	Leu	Ile	Tyr	Gln	Asn	Thr	Thr	Ala
	1325						1330					1335			
	Met	Thr	Ile	Tyr	Glu	Asn	Leu	Ala	Pro	Val	Thr	Thr	Phe	Gly	Lys
	1340						1345					1350			
	Thr	Asn	Gly	Tyr	Ile	Ala	Ser	Gly	Ser						
40	1355						1360								
	<210>	51													
	<211>	424													
	<212>	Белок													
	<213>	Искусственная последовательность													
45	<220>														
	<223>	CAR на основе APRIL (на основе индуцирующего пролиферацию лиганда),													
		APRIL CAR со стеблем CD8													
	<400>	51													

RU 2717984 C2

	Met	Glu	Thr	Asp	Thr	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Pro
	1				5					10					15	
	Gly	Ser	Thr	Gly	Ser	Val	Leu	His	Leu	Val	Pro	Ile	Asn	Ala	Thr	Ser
				20					25					30		
5	Lys	Asp	Asp	Ser	Asp	Val	Thr	Glu	Val	Met	Trp	Gln	Pro	Ala	Leu	Arg
		35						40					45			
	Arg	Gly	Arg	Gly	Leu	Gln	Ala	Gln	Gly	Tyr	Gly	Val	Arg	Ile	Gln	Asp
		50					55					60				
	Ala	Gly	Val	Tyr	Leu	Leu	Tyr	Ser	Gln	Val	Leu	Phe	Gln	Asp	Val	Thr
10	65					70					75					80
	Phe	Thr	Met	Gly	Gln	Val	Val	Ser	Arg	Glu	Gly	Gln	Gly	Arg	Gln	Glu
				85						90					95	
	Thr	Leu	Phe	Arg	Cys	Ile	Arg	Ser	Met	Pro	Ser	His	Pro	Asp	Arg	Ala
				100					105					110		
15	Tyr	Asn	Ser	Cys	Tyr	Ser	Ala	Gly	Val	Phe	His	Leu	His	Gln	Gly	Asp
		115						120					125			
	Ile	Leu	Ser	Val	Ile	Ile	Pro	Arg	Ala	Arg	Ala	Lys	Leu	Asn	Leu	Ser
		130					135					140				
	Pro	His	Gly	Thr	Phe	Leu	Gly	Phe	Val	Lys	Leu	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser
20	145					150				155						160
	Asp	Pro	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr
				165						170					175	
	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala
				180						185				190		
25	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile
		195						200					205			
	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu
		210					215					220				
	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser
30	225					230					235					240
	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly
				245						250					255	
	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	Pro	Pro	Arg	Asp	Phe	Ala
				260					265					270		
35	Ala	Tyr	Arg	Ser	Arg	Asp	Gln	Arg	Leu	Pro	Pro	Asp	Ala	His	Lys	Pro
		275						280					285			
	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Phe	Arg	Thr	Pro	Ile	Gln	Glu	Glu	Gln	Ala	Asp
		290					295					300				
	Ala	His	Ser	Thr	Leu	Ala	Lys	Ile	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala
40	305					310					315					320
	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu
				325						330				335		
	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly
				340					345					350		
45	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu
		355						360					365			
	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser
		370					375					380				

Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
 385 390 395 400
 Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
 405 410 415
 5 His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 420
 <210> 52
 <211> 398
 <212> Белок
 10 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> CAR на основе APRIL (на основе индуцирующего пролиферацию лиганда),
 APRIL CAR на основе шарнира IgG1
 <400> 52
 15 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Ser Val Leu His Leu Val Pro Ile Asn Ala Thr Ser
 20 25 30
 Lys Asp Asp Ser Asp Val Thr Glu Val Met Trp Gln Pro Ala Leu Arg
 35 40 45
 20 Arg Gly Arg Gly Leu Gln Ala Gln Gly Tyr Gly Val Arg Ile Gln Asp
 50 55 60
 Ala Gly Val Tyr Leu Leu Tyr Ser Gln Val Leu Phe Gln Asp Val Thr
 65 70 75 80
 25 Phe Thr Met Gly Gln Val Val Ser Arg Glu Gly Gln Gly Arg Gln Glu
 85 90 95
 Thr Leu Phe Arg Cys Ile Arg Ser Met Pro Ser His Pro Asp Arg Ala
 100 105 110
 Tyr Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Val Phe His Leu His Gln Gly Asp
 115 120 125
 30 Ile Leu Ser Val Ile Ile Pro Arg Ala Arg Ala Lys Leu Asn Leu Ser
 130 135 140
 Pro His Gly Thr Phe Leu Gly Phe Val Lys Leu Ser Gly Gly Gly Ser
 145 150 155 160
 35 Asp Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 165 170 175
 Cys Pro Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val
 180 185 190
 Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp
 195 200 205
 40 Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met
 210 215 220
 Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala
 225 230 235 240
 45 Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Asp Gln Arg Leu Pro
 245 250 255
 Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile
 260 265 270

Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg Val
275 280 285
Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
290 295 300
5 Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
305 310 315 320
Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
325 330 335
Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
10 340 345 350
Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
355 360 365
Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
370 375 380
15 Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
385 390 395
<210> 53
<211> 614
<212> Белок
20 <213> Искусственная последовательность
<220>
<223> CAR на основе APRIL (на основе индуцирующего пролиферацию лиганда),
APRIL CAR на основе Fc-pvaa
<400> 53
25 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15
Gly Ser Thr Gly Ser Val Leu His Leu Val Pro Ile Asn Ala Thr Ser
20 25 30
Lys Asp Asp Ser Asp Val Thr Glu Val Met Trp Gln Pro Ala Leu Arg
30 35 40 45
Arg Gly Arg Gly Leu Gln Ala Gln Gly Tyr Gly Val Arg Ile Gln Asp
50 55 60
Ala Gly Val Tyr Leu Leu Tyr Ser Gln Val Leu Phe Gln Asp Val Thr
65 70 75 80
35 Phe Thr Met Gly Gln Val Val Ser Arg Glu Gly Gln Gly Arg Gln Glu
85 90 95
Thr Leu Phe Arg Cys Ile Arg Ser Met Pro Ser His Pro Asp Arg Ala
100 105 110
Tyr Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Val Phe His Leu His Gln Gly Asp
40 115 120 125
Ile Leu Ser Val Ile Ile Pro Arg Ala Arg Ala Lys Leu Asn Leu Ser
130 135 140
Pro His Gly Thr Phe Leu Gly Phe Val Lys Leu Ser Gly Gly Gly Ser
145 150 155 160
45 Asp Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
165 170 175
Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
180 185 190

RU 2717984 C2

	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ala	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
				195				200					205			
	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
				210				215					220			
5	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
						225		230			235					240
	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
					245					250					255	
	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
10				260					265					270		
	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
				275				280					285			
	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
				290				295					300			
15	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
						305		310			315					320
	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
					325					330					335	
	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
20				340					345					350		
	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
				355				360					365			
	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
						370		375				380				
25	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Lys	Asp	Pro	Lys	Phe	Trp
						385		390			395					400
	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val
					405					410					415	
	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu
30				420					425					430		
	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr
				435				440					445			
	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	Pro	Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr
				450				455				460				
35	Arg	Ser	Arg	Asp	Gln	Arg	Leu	Pro	Pro	Asp	Ala	His	Lys	Pro	Pro	Gly
						465		470			475					480
	Gly	Gly	Ser	Phe	Arg	Thr	Pro	Ile	Gln	Glu	Glu	Gln	Ala	Asp	Ala	His
					485					490				495		
	Ser	Thr	Leu	Ala	Lys	Ile	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala
40				500					505					510		
	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu
				515				520					525			
	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp
				530				535				540				
45	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu
						545		550			555					560
	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile
					565					570					575	

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
 580 585 590
 Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
 595 600 605
 5 Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 610

(57) Формула изобретения

1. Цитотоксическая Т-клетка, способная уничтожить опухолевую клетку-мишень, экспрессирующую первый антиген и второй антиген, где Т-клетка совместно экспрессирует первый химерный антигенный рецептор (CAR) и второй CAR на клеточной поверхности, где каждый CAR содержит:

(i) антигенсвязывающий домен;

(ii) спейсер;

(iii) трансмембранный домен; и

(iv) эндодомен,

где спейсер первого CAR отличается от спейсера второго CAR, в которой первый CAR связывает первый антиген и представляет собой активирующий CAR, который содержит активирующий эндодомен, содержащий домен иммунорецепторного тирозинового активирующего мотива (ITAM), где активирующий эндодомен содержит эндодомен CD3 ξ , и

где второй CAR связывает второй антиген и представляет собой ингибирующий CAR, который содержит ингибирующий эндодомен, где ингибирующий эндодомен содержит домен тирозиновой фосфатазы CD148 или CD45.

2. Т-клетка по п.1, в которой спейсер первого CAR имеет длину, и/или заряд, и/или размер, и/или конфигурацию, и/или гликозилирование, отличающиеся от спейсера второго CAR, так что, когда первый CAR и второй CAR связывают соответствующие им антигены-мишени, первый CAR и второй CAR становятся пространственно разделенными на мембране Т-клетки.

3. Т-клетка по любому из пп. 1 или 2, в которой или первый спейсер, или второй спейсер содержит «стебель» CD8, и другой спейсер содержит шарнирную область, домен CH2 и домен CH3 из IgG1.

4. Т-клетка по любому из пп. 1-3, в которой антигенсвязывающий домен первого CAR связывает CD5, и антигенсвязывающий домен второго CAR связывает CD19.

5. Нуклеиновая кислота, которая кодирует первый химерный антигенный рецептор (CAR) и второй CAR на клеточной поверхности, где каждый CAR содержит:

(i) антигенсвязывающий домен;

(ii) спейсер;

(iii) трансмембранный домен; и

(iv) эндодомен,

где спейсер первого CAR отличается от спейсера второго CAR, в которой первый CAR связывает первый антиген и представляет собой активирующий CAR, который содержит активирующий эндодомен, содержащий домен иммунорецепторного тирозинового активирующего мотива (ITAM), где активирующий эндодомен содержит эндодомен CD3 ξ , и

где второй CAR связывает второй антиген и представляет собой ингибирующий CAR, который содержит ингибирующий эндодомен, где ингибирующий эндодомен содержит домен тирозиновой фосфатазы CD148 или CD45.

6. Нуклеиновая кислота по п. 5, в которой спейсер первого CAR имеет длину, и/или заряд, и/или размер, и/или конфигурацию, и/или гликозилирование, отличающиеся от спейсера второго CAR, так что, когда первый CAR и второй CAR связывают соответствующие им антигены-мишени, первый CAR и второй CAR становятся

5 пространственно разделенными на мембране Т-клетки.

7. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 5 или 6, в которой или первый спейсер, или второй спейсер содержит «стебель» CD8, и другой спейсер содержит шарнирную область, CH2 домен и CH3 домен из IgG1.

8. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 5-7, в которой антигенсвязывающий домен

10 первого CAR связывает CD5, и антигенсвязывающий домен второго CAR связывает CD19.

9. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 5-8, которая имеет следующую структуру: AgB1-спейсер1-TM1-эндо1-коэкспр-AbB2-спейсер2-TM2-эндо2, в которой

15 AgB1 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует антигенсвязывающий домен первого CAR;

спейсер1 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует спейсер первого CAR;

20 TM1 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует трансмембранный домен первого CAR;

эндо1 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует эндодомен первого CAR;

коэкспр представляет собой нуклеиновую кислоту, которая делает возможной коэкспрессию обоих CAR;

25 AbB2 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует антигенсвязывающий домен второго CAR;

спейсер2 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует спейсер второго CAR;

30 TM2 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует трансмембранный домен второго CAR;

эндо2 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует эндодомен второго CAR;

35 где нуклеиновая кислота, когда экспрессирована в Т-клетке, кодирует полипептид, который расщепляется в сайте расщепления так, что первый и второй CAR совместно экспрессированы на поверхности Т-клетки.

10. Нуклеиновая кислота по п. 9, в которой коэкспр кодирует последовательность, которая содержит саморасщепляющийся пептид.

40 11. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 5-10, в которой в областях, кодирующих те же или схожие аминокислотные последовательности, во избежание гомологичной рекомбинации используют альтернативные кодоны.

12. Набор нуклеиновых кислот для получения клетки по любому из пп. 1-4, который содержит

(i) первую нуклеиновую кислоту, которая кодирует первый химерный антигенный рецептор (CAR), где нуклеиновая кислота имеет следующую структуру:

45 AgB1-спейсер1-TM1-эндо1, в которой

AgB1 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует антигенсвязывающий домен первого CAR;

спейсер1 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует спейсер первого

CAR;

TM1 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует трансмембранный домен первого CAR;

эндо1 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует эндодомен первого CAR; и

(ii) вторую нуклеиновую кислоту, которая кодирует второй химерный антигенный рецептор (CAR), где указанная нуклеиновая кислота имеет следующую структуру:

AgB2-спейсер2-TM2-эндо2, где

AgB2 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует антигенсвязывающий домен второго CAR;

спейсер2 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует спейсер второго CAR;

TM2 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует трансмембранный домен второго CAR;

эндо2 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует эндодомен второго CAR, где спейсер первого CAR отличается от спейсера второго CAR, причём первый CAR связывает первый антиген и представляет собой активирующий CAR, который содержит активирующий эндодомен, содержащий домен иммунорецепторного тирозинового активирующего мотива (ITAM), где активирующий эндодомен содержит

эндодомен CD3 ξ , и

при этом второй CAR связывает второй антиген и представляет собой ингибирующий CAR, который содержит ингибирующий эндодомен, где ингибирующий эндодомен содержит домен тирозиновой фосфатазы CD148 или CD45.

13. Набор нуклеиновых кислот для получения клетки по любому из пп. 1-4, который содержит:

(i) первый вектор, который содержит первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый химерный антигенный рецептор (CAR), где нуклеиновая кислота имеет следующую структуру:

AgB1-спейсер1-TM1-эндо1, в которой

AgB1 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует антигенсвязывающий домен первого CAR;

спейсер1 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует спейсер первого CAR;

TM1 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует трансмембранный домен первого CAR;

эндо1 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует эндодомен первого CAR; и

(ii) второй вектор, который содержит вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй химерный антигенный рецептор (CAR), где указанная нуклеиновая кислота имеет следующую структуру:

AgB2-спейсер2-TM2-эндо2, где

AgB2 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует антигенсвязывающий домен второго CAR;

спейсер2 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует спейсер второго CAR;

TM2 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует трансмембранный домен второго CAR;

эндо2 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует эндодомен

второго CAR, где спейсер первого CAR отличается от спейсера второго CAR, причём первый CAR связывает первый антиген и представляет собой активирующий CAR, который содержит активирующий эндодомен, содержащий домен иммунорецепторного тирозинового активирующего мотива (ITAM), где активирующий эндодомен содержит

5 эндодомен CD3 ξ , и

при этом второй CAR связывает второй антиген и представляет собой ингибирующий CAR, который содержит ингибирующий эндодомен, где ингибирующий эндодомен содержит домен тирозиновой фосфатазы CD148 или CD45.

14. Набор по п. 13, в котором векторы представляют собой интегрирующие вирусные

10 векторы или транспозоны.

15. Вектор для получения Т-клетки по любому из пп. 1-4, который содержит нуклеиновую кислоту по пп. 5-11.

16. Вектор для получения Т-клетки по п. 15, который представляет собой ретровирусный вектор или лентивирусный вектор или транспозон.

15 17. Способ получения цитотоксической Т-клетки по любому из пп. 1-4, который включает стадию введения:

(a) первого вектора экспрессии и второго вектора экспрессии, где

(i) первый вектор экспрессии содержит первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый химерный антигенный рецептор (CAR), где нуклеиновая кислота имеет

20 следующую структуру:

AgB1-спейсер1-TM1-эндо1, в которой

AgB1 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует антигенсвязывающий домен первого CAR;

спейсер1 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует спейсер первого

25 CAR;

TM1 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует трансмембранный домен первого CAR;

эндо1 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует эндодомен первого CAR; и

30 (ii) второй вектор экспрессии содержит вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй химерный антигенный рецептор (CAR), где указанная нуклеиновая кислота имеет следующую структуру:

AgB2-спейсер2-TM2-эндо2, где

AgB2 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует

35 антигенсвязывающий домен второго CAR;

спейсер2 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует спейсер второго CAR;

TM2 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует трансмембранный домен второго CAR;

40 эндо2 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует эндодомен второго CAR, где спейсер первого CAR отличается от спейсера второго CAR, причём первый CAR связывает первый антиген и представляет собой активирующий CAR, который содержит активирующий эндодомен, содержащий домен иммунорецепторного тирозинового активирующего мотива (ITAM), где активирующий эндодомен содержит

45 эндодомен CD3 ξ , и

при этом второй CAR связывает второй антиген и представляет собой ингибирующий CAR, который содержит ингибирующий эндодомен, где ингибирующий эндодомен содержит домен тирозиновой фосфатазы CD148 или CD45; или

(b) вектора по любому из пп. 15 или 16 в цитотоксическую Т-клетку.

18. Способ по п. 17, в котором указанная цитотоксическая Т-клетка происходит из образца, выделенного у субъекта.

19. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания путем уничтожения
5 опухолевых клеток-мишеней, экспрессирующих первый антиген и второй антиген, которая содержит множество Т-клеток по любому из пп. 1-4.

20. Способ лечения и/или предотвращения заболевания путем уничтожения
10 опухолевых клеток-мишеней, экспрессирующих первый антиген и второй антиген, который включает стадию введения эффективного количества фармацевтической композиции по п.19 субъекту.

21. Способ по п.20, который включает следующие стадии:

(i) выделение содержащего Т-клетки образца у субъекта;

(ii) трансдукция или трансфекция Т-клеток с использованием:

(a) нуклеиновой кислоты по любому из пп. 5-11;

15 (b) первой нуклеиновой кислоты и второй нуклеиновой кислоты, где

i. первая нуклеиновая кислота кодирует первый химерный антигенный рецептор (CAR), где нуклеиновая кислота имеет следующую структуру:

AgB1-спейсер1-TM1-эндо1, в которой

20 AgB1 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует антигенсвязывающий домен первого CAR;

спейсер1 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует спейсер первого CAR;

TM1 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует трансмембранный домен первого CAR;

25 эндо1 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует эндодомен первого CAR; и

ii. вторая нуклеиновая кислота кодирует второй химерный антигенный рецептор (CAR), где указанная нуклеиновая кислота имеет следующую структуру:

AgB2-спейсер2-TM2-эндо2, где

30 AgB2 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует антигенсвязывающий домен второго CAR;

спейсер2 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует спейсер второго CAR;

35 TM2 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует трансмембранный домен второго CAR;

эндо2 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует эндодомен второго CAR, где спейсер первого CAR отличается от спейсера второго CAR, причём первый CAR связывает первый антиген и представляет собой активирующий CAR, который содержит активирующий эндодомен, содержащий домен иммунорецепторного тирозинового активирующего мотива (ITAM), где активирующий эндодомен содержит
40 эндодомен CD3 ξ , и

при этом второй CAR связывает второй антиген и представляет собой ингибирующий CAR, который содержит ингибирующий эндодомен, где ингибирующий эндодомен содержит домен тирозиновой фосфатазы CD148 или CD45;

45 (c) первого вектора и второго вектора, где

i. первый вектор содержит первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый химерный антигенный рецептор (CAR), где нуклеиновая кислота имеет следующую структуру:

AgB1-спейсер1-ТМ1-эндо1, в которой

AgB1 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует антигенсвязывающий домен первого CAR;

спейсер1 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует спейсер первого CAR;

ТМ1 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует трансмембранный домен первого CAR;

эндо1 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует эндодомен первого CAR; и

ii. второй вектор содержит вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй химерный антигенный рецептор (CAR), где указанная нуклеиновая кислота имеет следующую структуру:

AgB2-спейсер2-ТМ2-эндо2, где

AgB2 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует антигенсвязывающий домен второго CAR;

спейсер2 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует спейсер второго CAR;

ТМ2 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует трансмембранный домен второго CAR;

эндо2 представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует эндодомен второго CAR, где спейсер первого CAR отличается от спейсера второго CAR, причём первый CAR связывает первый антиген и представляет собой активирующий CAR, который содержит активирующий эндодомен, содержащий домен иммунорецепторного тирозинового активирующего мотива (ITAM), где активирующий эндодомен содержит

эндодомен CD3 ξ , и

при этом второй CAR связывает второй антиген и представляет собой ингибирующий CAR, который содержит ингибирующий эндодомен, где ингибирующий эндодомен содержит домен тирозиновой фосфатазы CD148 или CD45; или

(d) вектора по п.15 или 16; и

(iii) введение Т-клеток из (ii) субъекту.

22. Способ по любому из пп. 20 или 21, в котором заболевание представляет собой злокачественную опухоль.

23. Применение фармацевтической композиции по п.19 для лечения и/или предотвращения заболевания путем уничтожения опухолевых клеток-мишеней,

экспрессирующих первый антиген и второй антиген.

24. Применение Т-клетки по любому из пп. 1-4 при изготовлении лекарственного средства для лечения и/или предотвращения заболевания путем уничтожения опухолевых клеток-мишеней, экспрессирующих первый антиген и второй антиген.

25. Применение Т-клетки по любому из пп. 1-4 для лечения и/или предотвращения заболевания путем уничтожения опухолевых клеток-мишеней, экспрессирующих первый антиген и второй антиген.

26. Клетка - естественный киллер (NK-клетка), способная уничтожить опухолевую клетку-мишень, экспрессирующую первый антиген и второй антиген, где NK-клетка совместно экспрессирует первый CAR и второй CAR на клеточной поверхности, где

каждый CAR содержит:

(i) антигенсвязывающий домен;

(ii) спейсер;

(iii) трансмембранный домен; и

(iv) эндодомен,

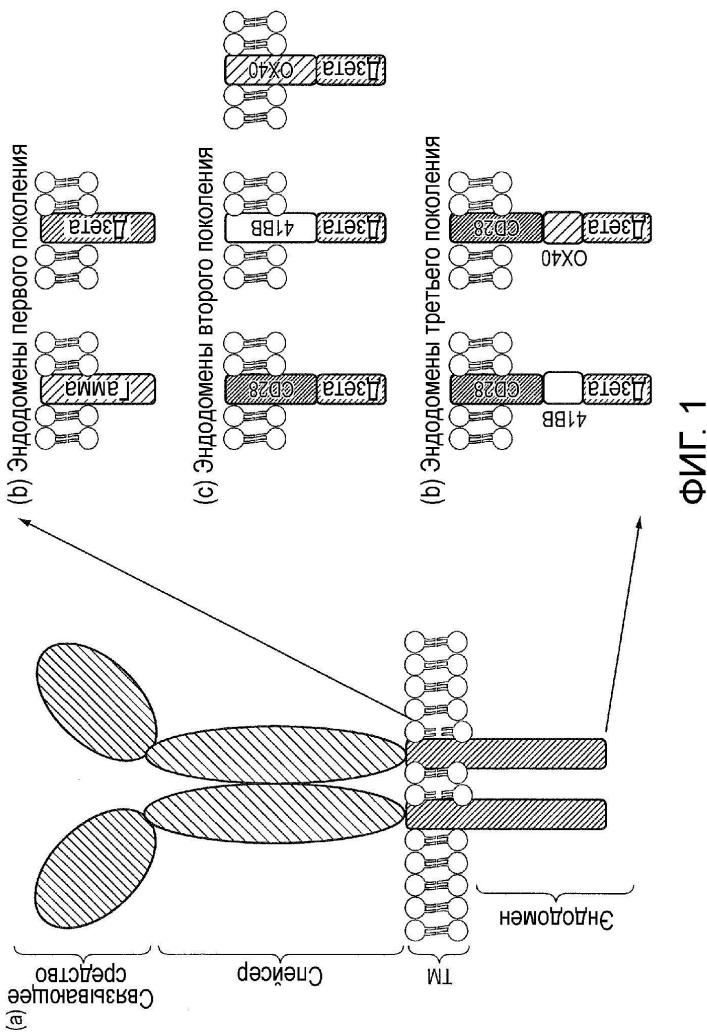
где спейсер первого CAR отличается от спейсера второго CAR, где первый CAR связывает первый антиген и представляет собой активирующий CAR, который содержит активирующий эндодомен, содержащий домен иммунорецепторного тирозинового активирующего мотива (ITAM), где активирующий эндодомен содержит эндодомен CD3 ξ , и

где второй CAR связывает второй антиген и представляет собой ингибирующий CAR, который содержит ингибирующий эндодомен, где ингибирующий эндодомен содержит домен тирозиновой фосфатазы CD148 или CD45.

27. Композиция клеток для лечения заболевания путем уничтожения опухолевых клеток-мишеней, экспрессирующих первый антиген и второй антиген, которая содержит экспрессирующие CAR Т-клетки по любому из пп. 1-4 и/или экспрессирующие CAR NK-клетки по п.26, полученные посредством трансдукции образца крови ex vivo с использованием нуклеиновой кислоты, кодирующей первый и второй CAR, по любому из пп. 5-11.

1

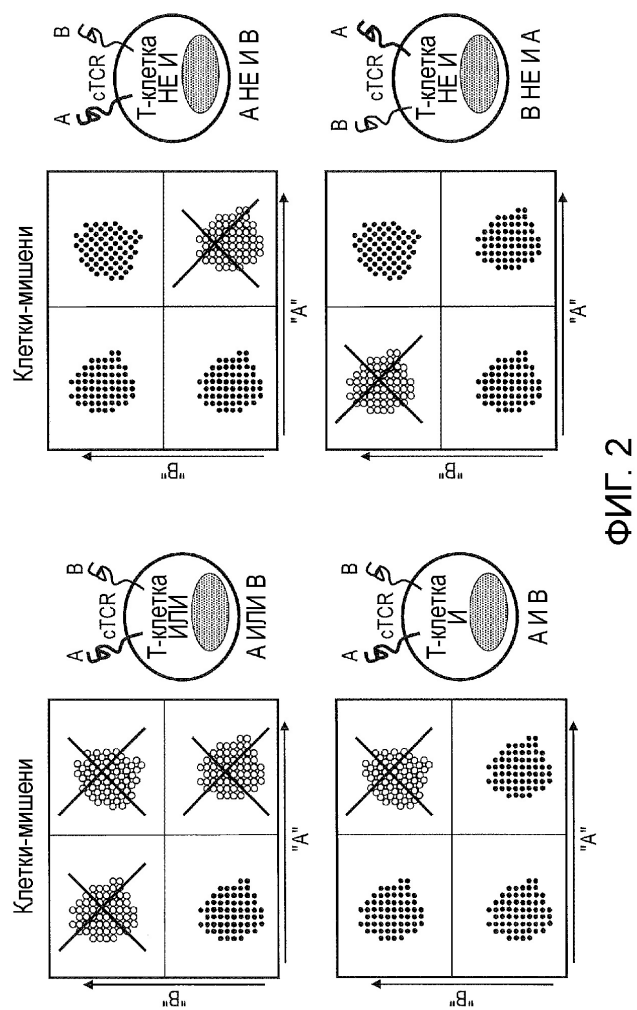
1/32

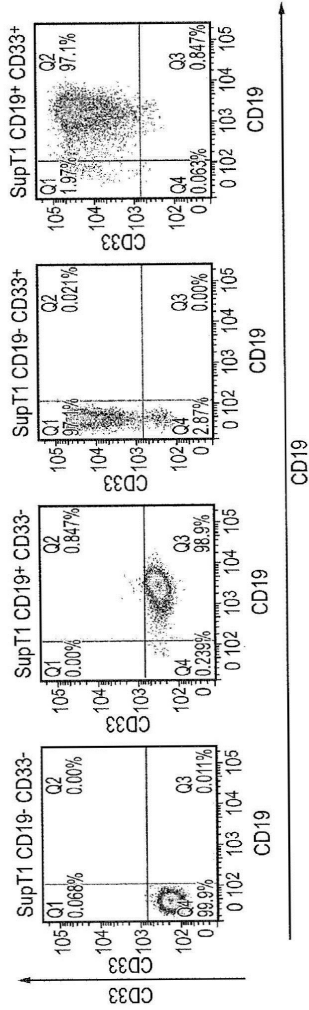


ФИГ. 1

2

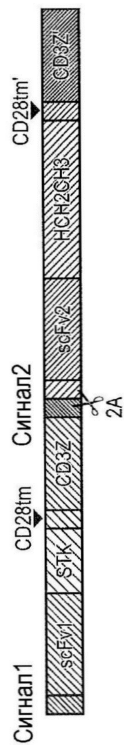
2/32



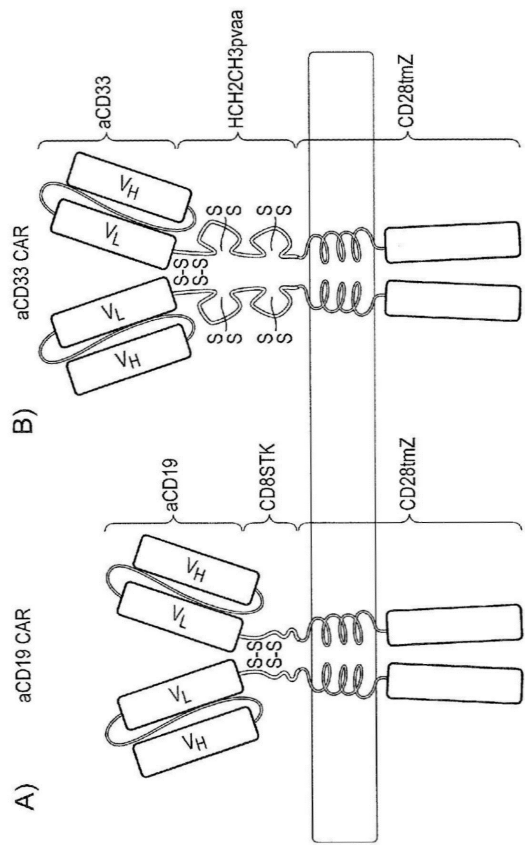


ФИГ. 3

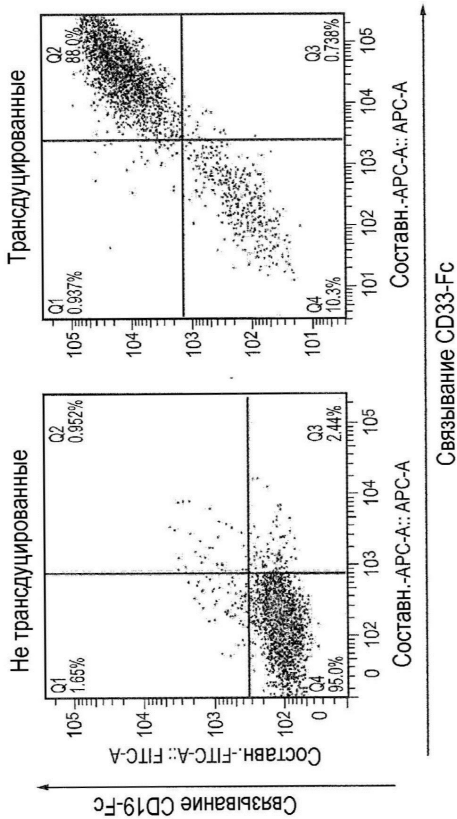
4/32



ФИГ. 4

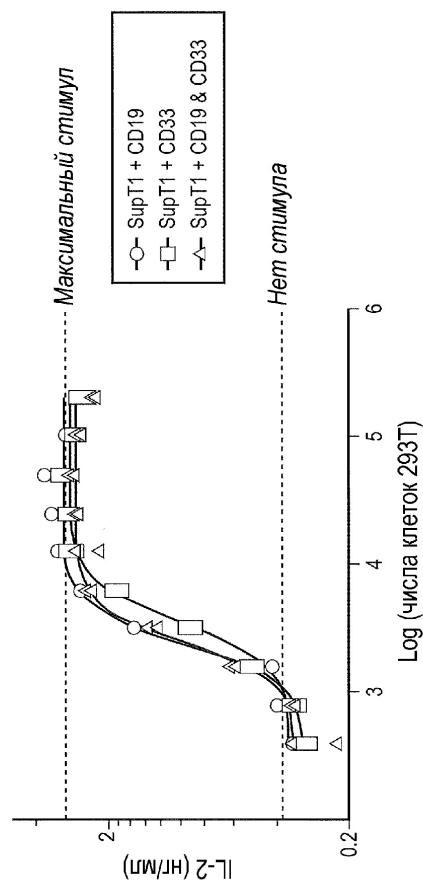


ФИГ. 5

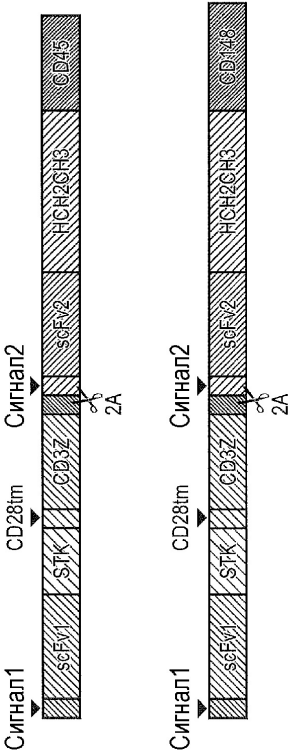


ФИГ. 6

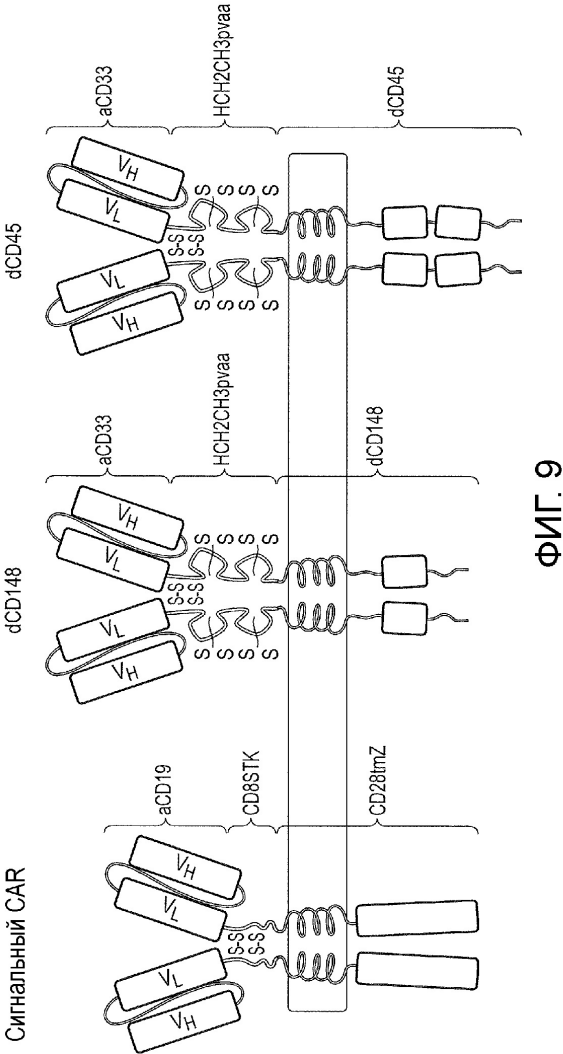
7/32

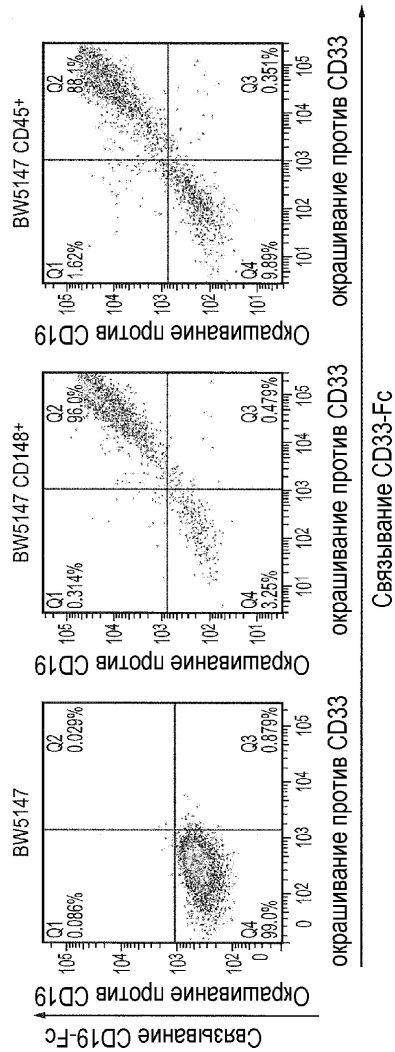


ФИГ. 7

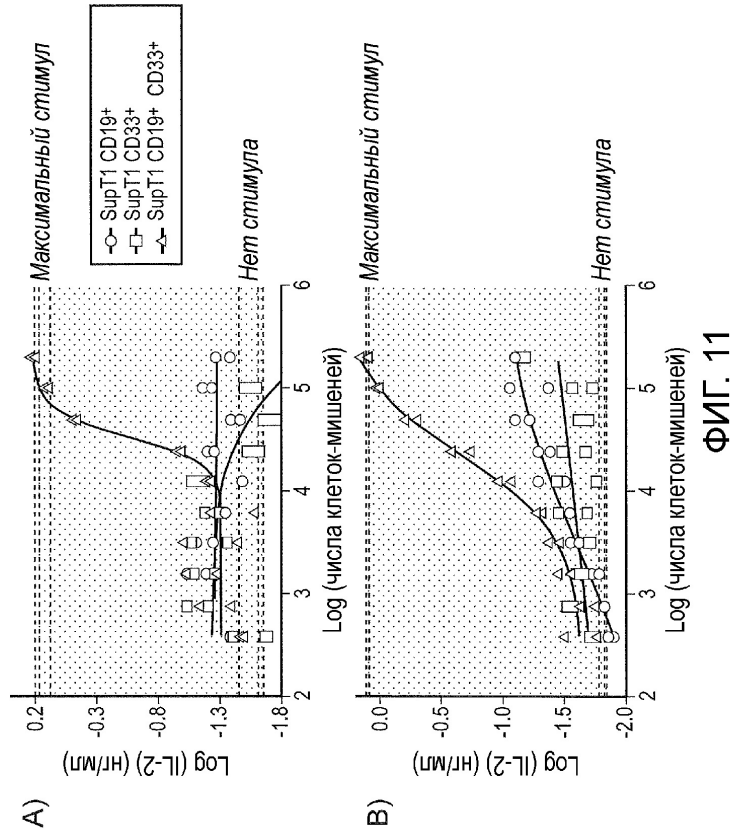


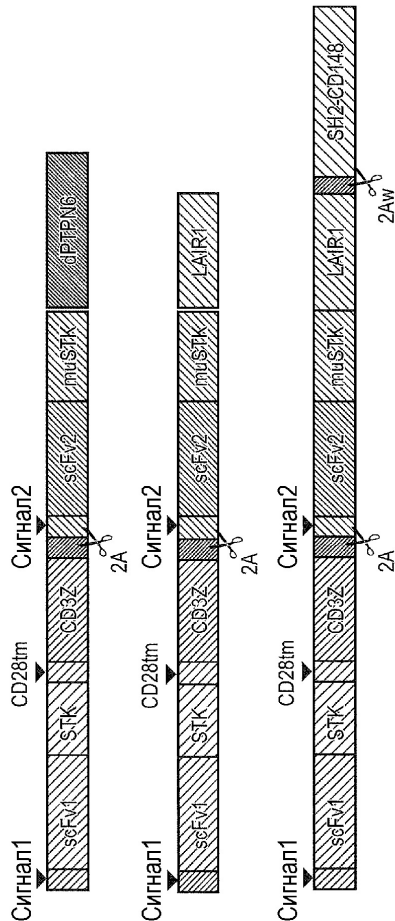
ФИГ. 8



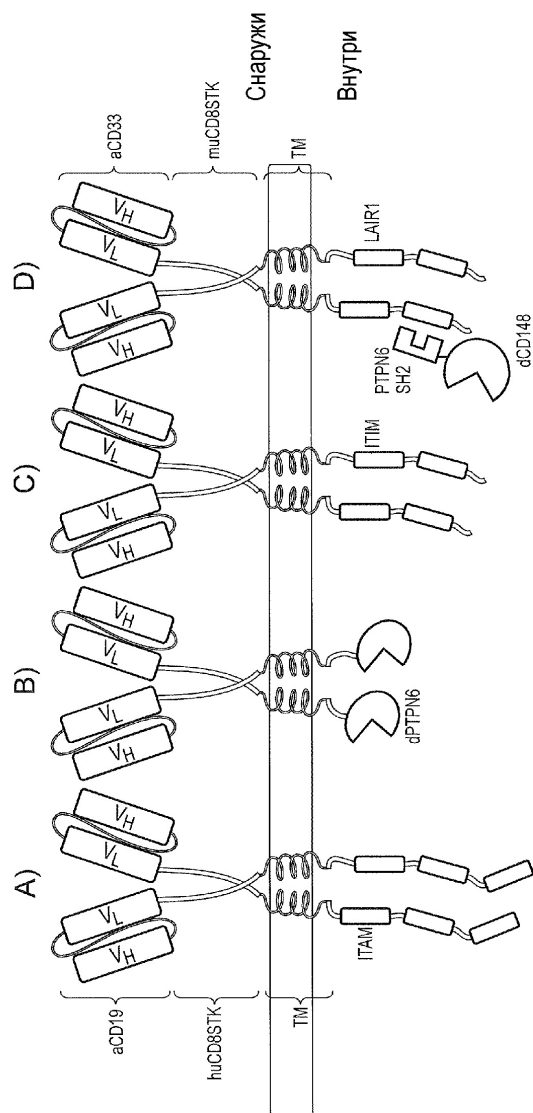


ФИГ. 10

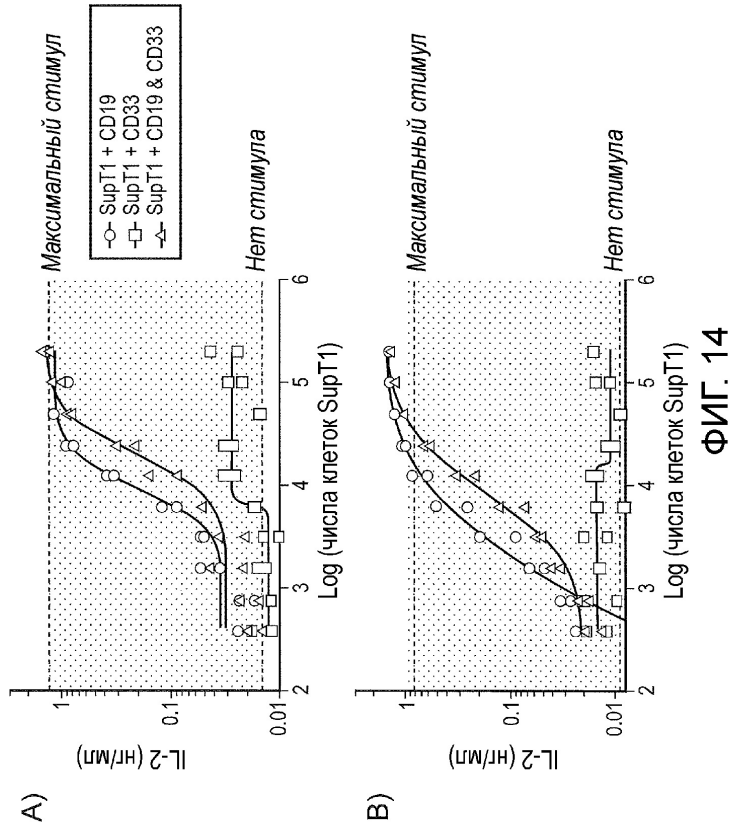




ФИГ. 12



ФИГ. 13



>MP13974.SFG.aCD19fmc63_clean-CD85TK-CD28tmZ-2A-aCD33glx-HCH2CH3pvaa-CD28tmZw

MSLPVTALLPLALLHAAREDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDIKYLWYQKPDGTVKLLIYHTSRIHSGVFSR
SGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQGNLTPYTFGGGTKEITKAGGGSGGGSGGGSGGGSEVKLQESGGLVAPSG
SLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPKGLWLVWGSSETTYNSALKSLTIKDNKSQVFLKMNSLQTDDETAIYYCAHY
FYGGSYAMDYWGQTSVTYS~~SDP~~FWVLVVGGLVAC
SLDVTVAFTIIFWVRRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNGRREYDVLDKRRGRDPEMGCKPRKNPQEGLYNELQDKMAE
AYSEIGMKGERRRGKGDHGLYQGLSTATKDTYDALHMCALPPRAEGRGSLITCGDVEENPGFMAVPTQVLGILLRLTDAR
DQMTQTSLSASLGDRVTISCRASQDIKYLWYQKPDGTVKLLIYHTSRIHSGVFSRSGSGSGTDYSLTISNLEQEDI
ATYFCQGNLTPYTFGGGTKEITKAGGGSGGGSGGGSGGGSEVKLQESGGLVAPSGSLSVTCTVSGVSLPDYGVSW
IRQPPKGLWLVWGSSETTYNSALKSLTIKDNKSQVFLKMNSLQTDDETAIYYCAHYFYGGSYAMDYWGQTSVTYS
SDPFWVLVVGGLVACSLDVTVAFTIIFWVRRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNGRREYDVLDKRRGRDPEMGCK
PRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDHGLYQGLSTATKDTYDALHMCALPPRAEGRGSLITCGD
VEENPGFMAVPTQVLGILLRLTDAR

Region	Description
Signal1	Сигнальный пептид 1
scFv1	scFv1 – против CD19
SDP	Линкер и разрыв цепи
CD8α	Стебель CD8α
CD28tmZ	Трансмембранный домен CD28 и эндодомен CD3ξ
FMD-2A	Пептид 2A ящура
Signal2	Сигнальный пептид 2
scFv2	scFv2 – против CD33
MDP	Линкер и разрыв цепи
HCH2CH3	Шарнир, CH2 и CH3 из IgG1 человека
CD28tmZ	Трансмембранный домен CD28 и эндодомен CD3ξ

ФИГ. 15

16/32

[illegible][illegible]

Region	Description
Signal1	Сигнальный пептид 1
scFv1	scFv1 – против CD19
SDP	Линкер и разрыв цепи
Stem	Стебель CD8α
CD28tm2	Трансмембранный домен CD28 и эндодомен CD3ε
FMD-2A	Пептид 2A ящура
Signal2	Сигнальный пептид 2
scFv2	scFv2 – против CD33
MDP	Линкер и разрыв цепи
HC2HC3	Шарнир, CH2 и CH3 из IgG1 человека
dCD148 / dCD45	Трансмембранный домен CD28 и эндодомен CD3ε

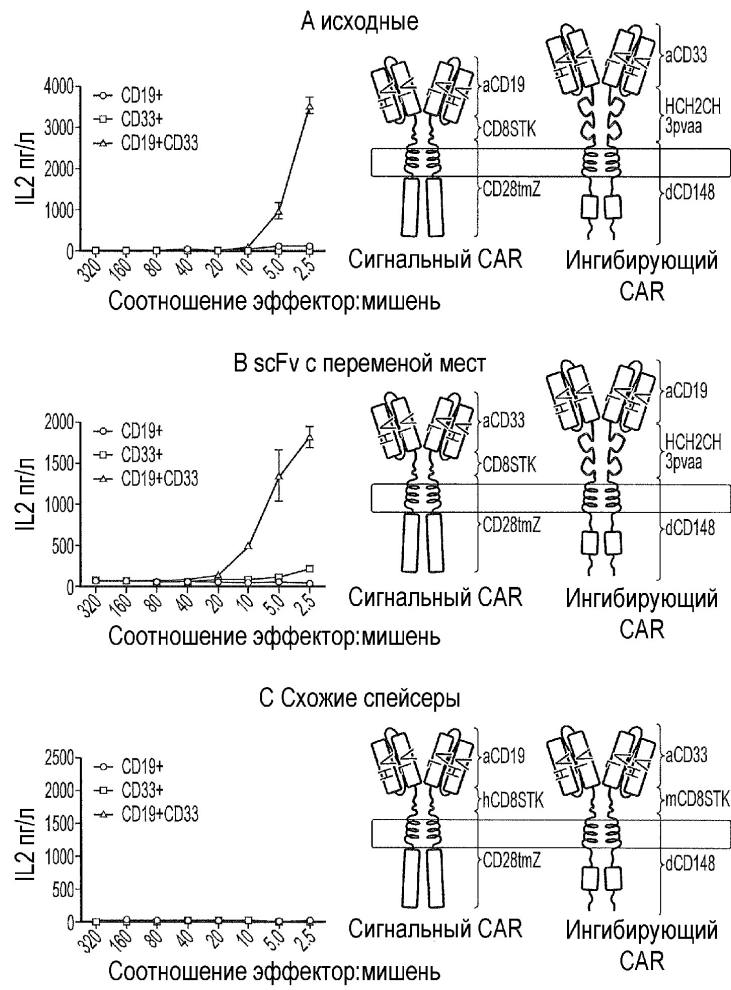
ФИГ. 16

17/32

[illegible]

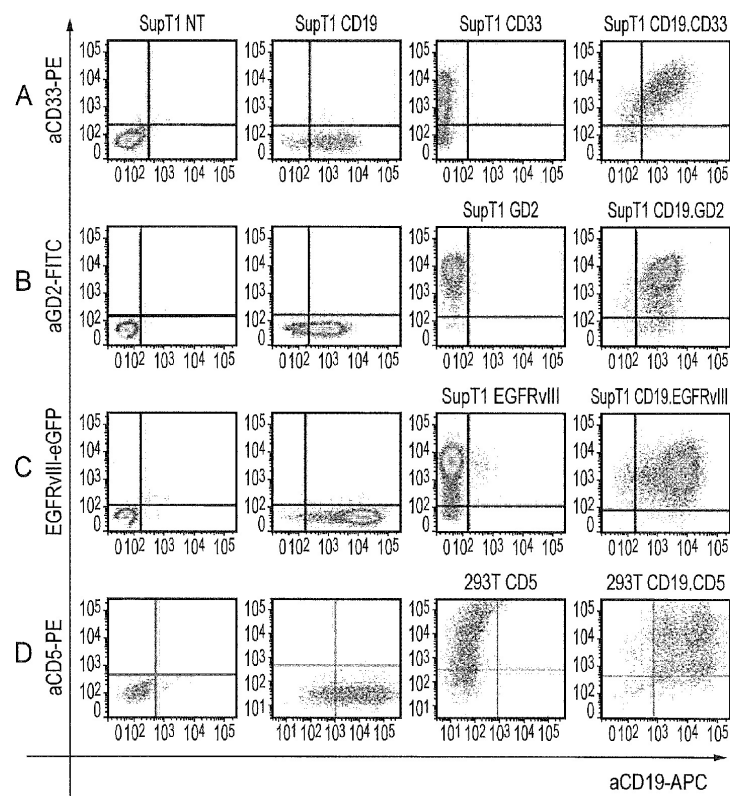
ФИГ. 17

18/32



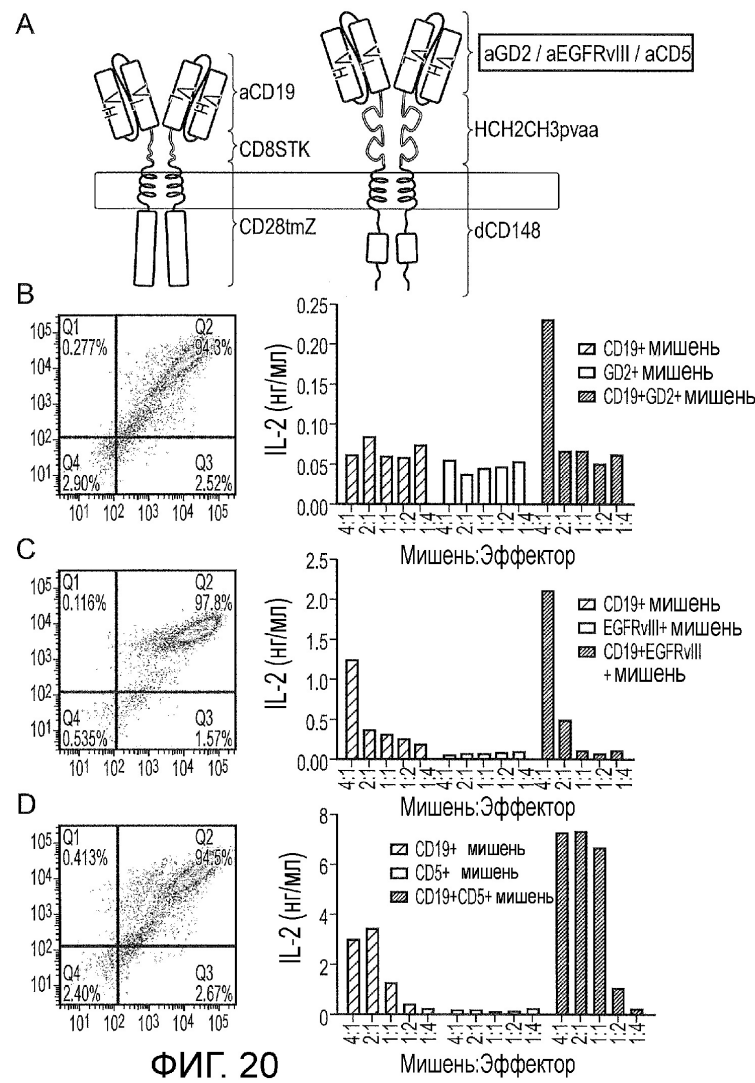
ФИГ. 18

19/32

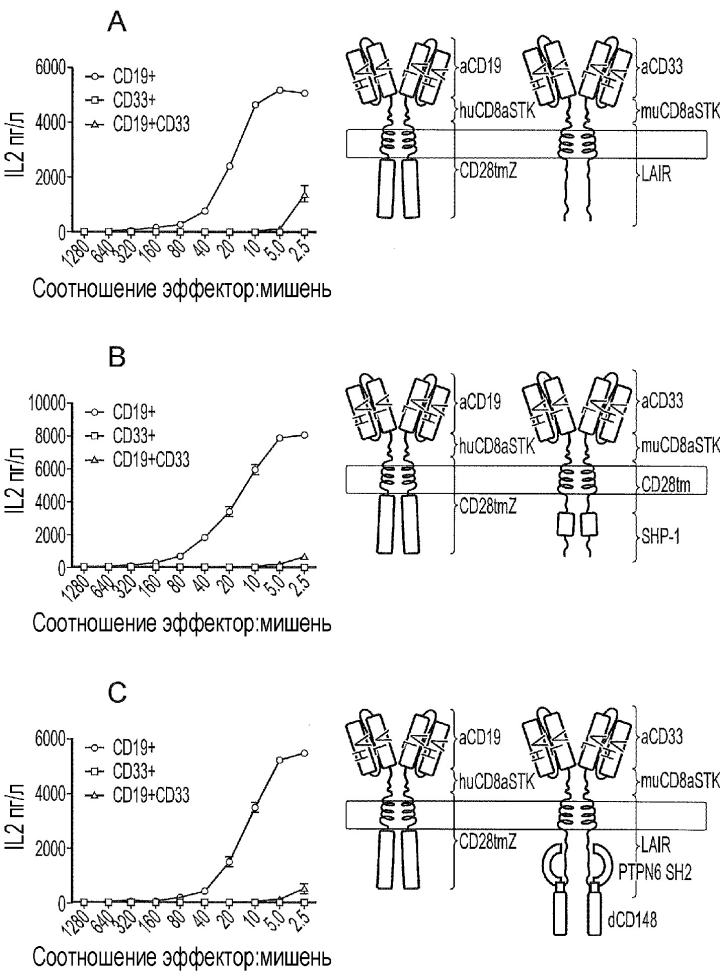


ФИГ. 19

20/32

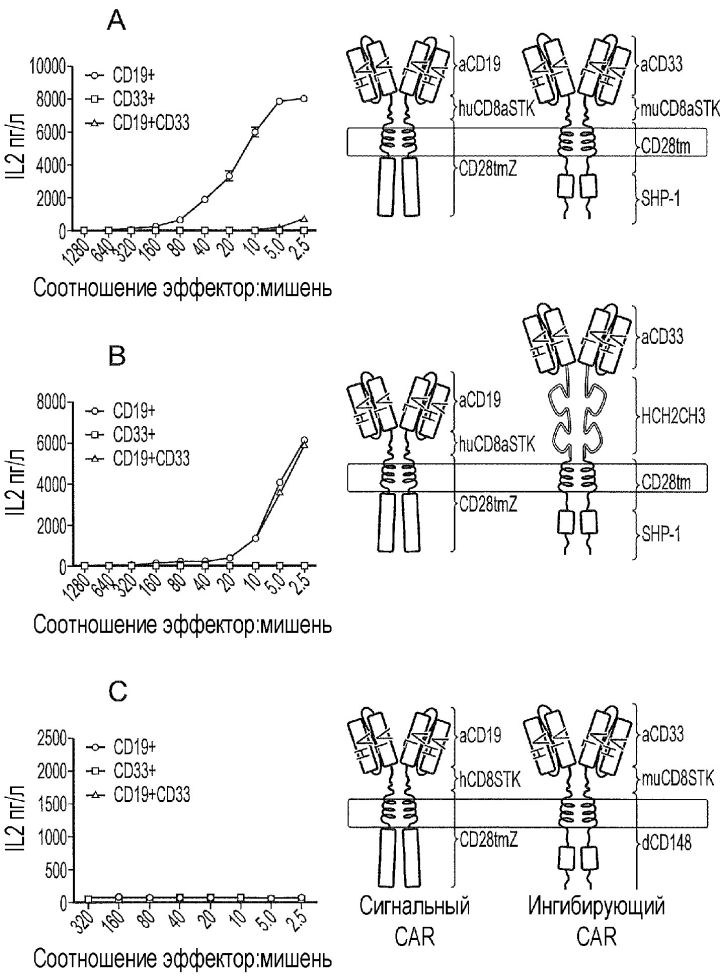


21/32



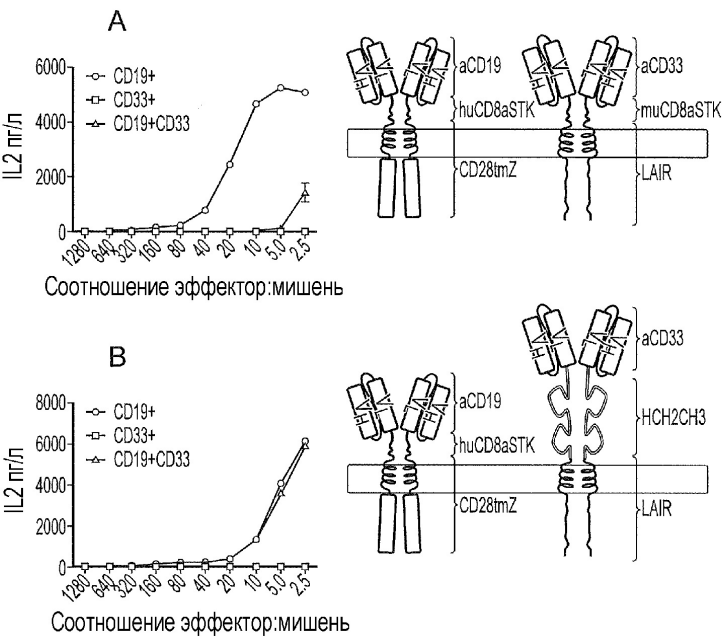
ФИГ. 21

22/32

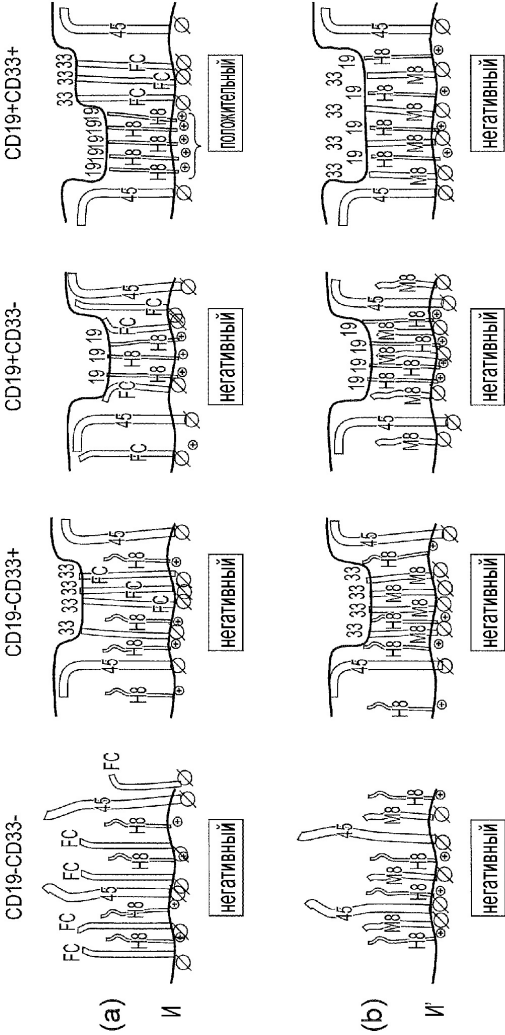


ФИГ. 22

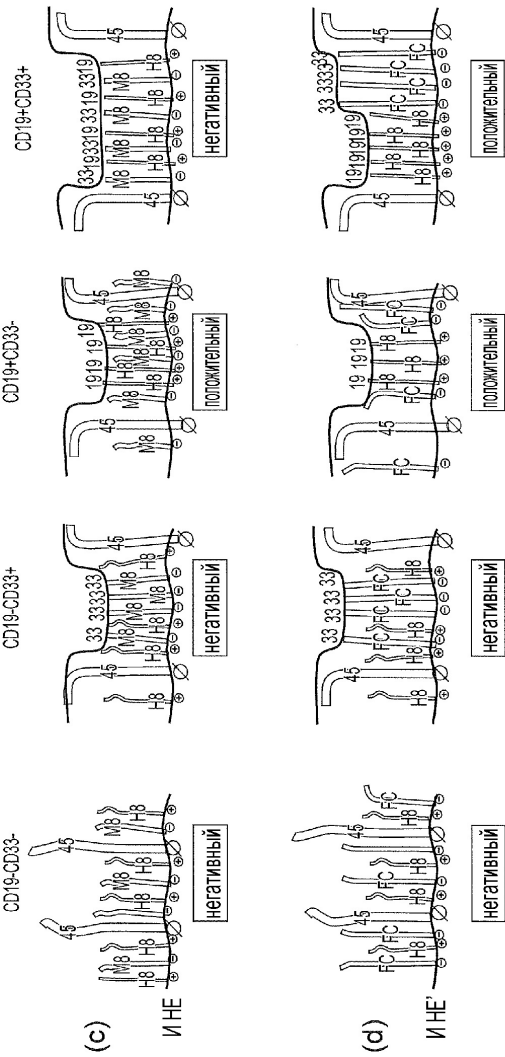
23/32



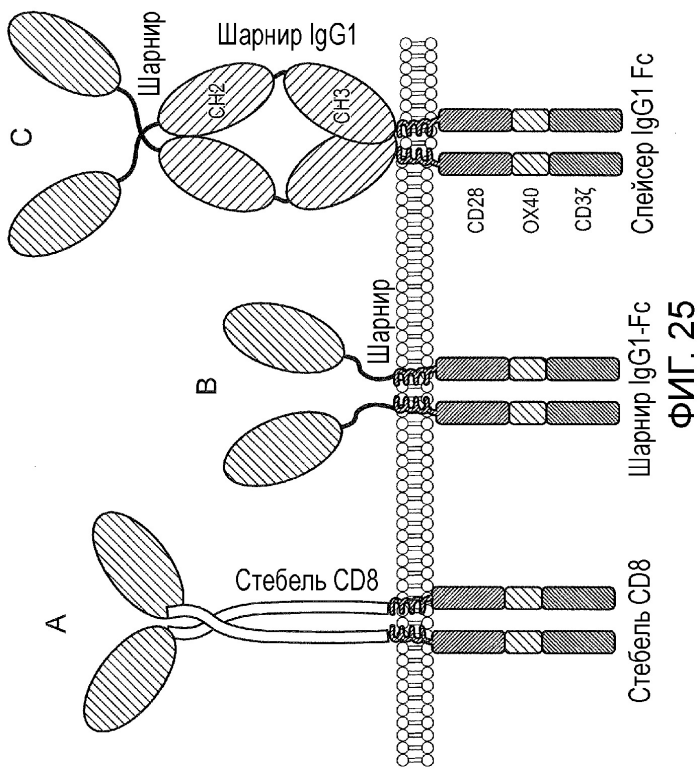
ФИГ. 23



ФИГ. 24



ФИГ. 24 (Продолжение)



27/32

A

METDITLLILWVLLWVPGSTGSLVHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRRGLQAQGYGVRIQDAGVY
 LLYSQVILFDVPTTVMGOVVSREGGQRTLEFCTRISMPSPHDRAINYSYCSAGVFHLLHGDDILSVIIPR
 ARAKNLSPVHGTFLGVFKL**SGGGSDPT**TFKPKPSTADTISGSSSLFEECPKPEAGGAGNPKGKIN
 LKLVVWVGVGLVACYSLLVTVAFITFPWRSKRSLLLHSDVMNMTPRRPGPTRKHYPQVYAPRDEFA
 WYRSRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKTRVVFSSADAPAYQOGGNQLYLNELNLGR
 REEYDVLDKRRGRDPMEGKKPRRKNPOEGLYNELQDKDMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTA
 PKDITYDALHMAKLPPI

B

[illegible]

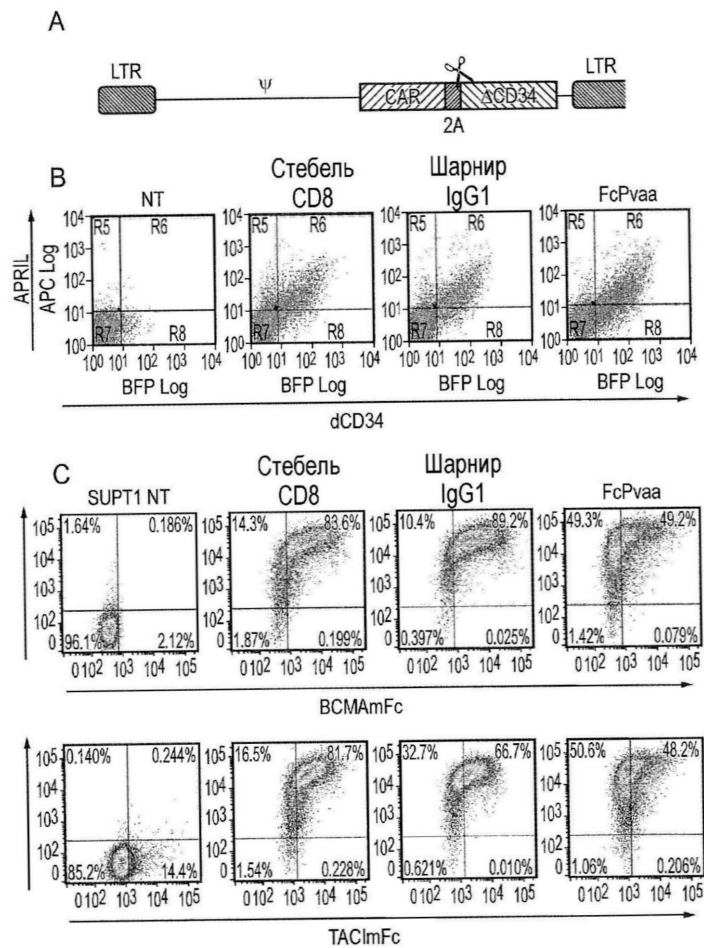
C

[illegible]

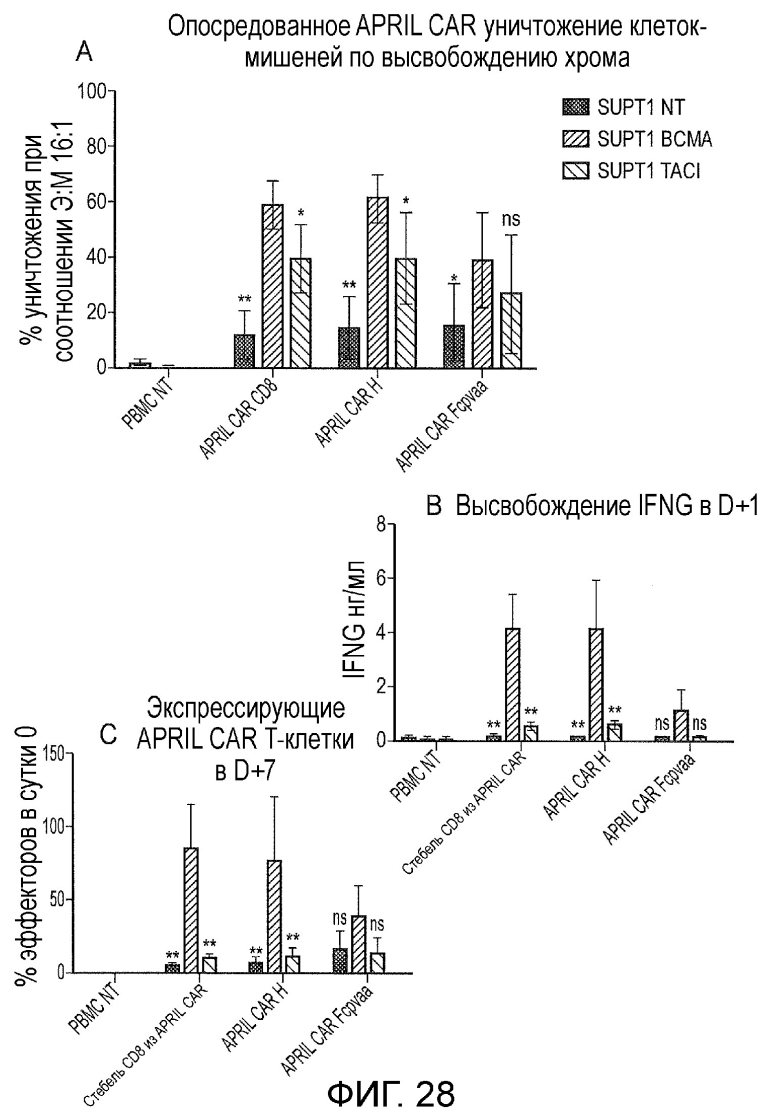
Сигнальный пептид	Эффективный сигнальный пептид
APRIL	Усеченный APRIL
Спейсер	Любой из шарнира-CH2CH3 из IgG1 человека, стебля CD8 человека и шарнира IgG1 человека
TM и эндодомен	Составной эндодомен, состоящий из CD28TM, эндодомена CD28 и эндодоменов OX40 and CD3E

ФИГ. 26

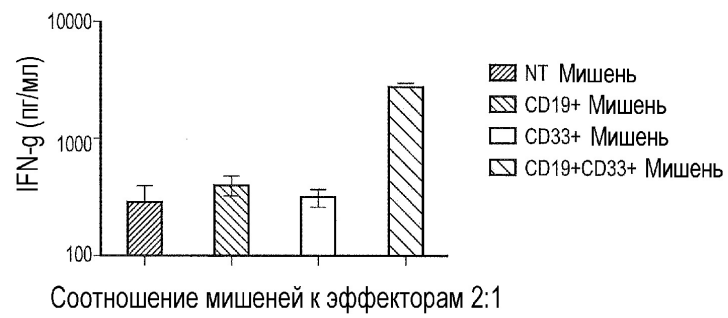
28/32



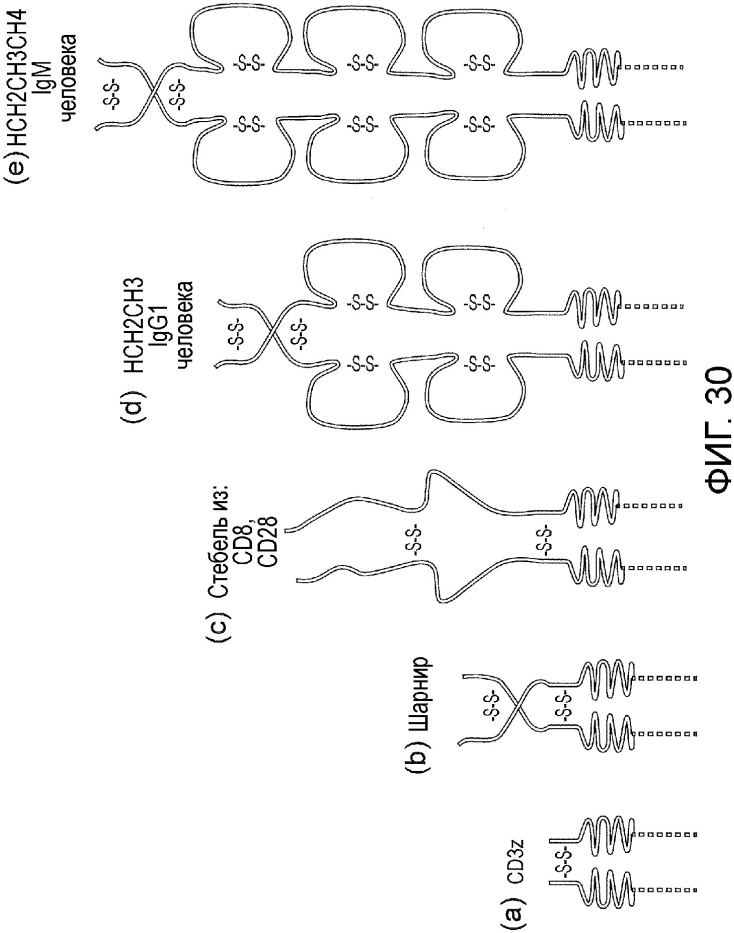
29/32

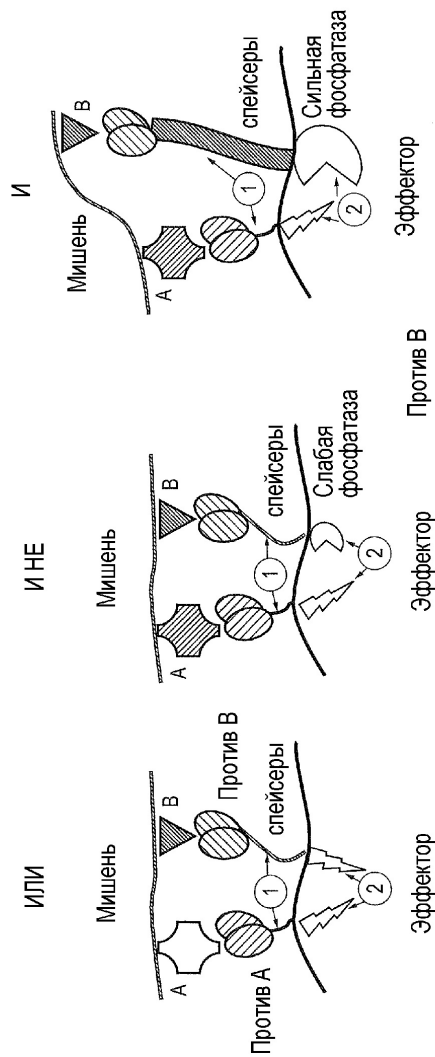


30/32



ФИГ. 29





ФИГ. 31