



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 35/17 (2019.08); C07K 14/7051 (2019.08); C07K 16/2866 (2019.08); A61K 2039/505 (2019.08); C07K 2317/622 (2019.08); C07K 2319/00 (2019.08)

(21)(22) Заявка: 2015140624, 14.03.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
14.03.2014

Дата регистрации:  
15.01.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
15.03.2013 US 13/844,048

(43) Дата публикации заявки: 26.04.2017 Бюл. № 12

(45) Опубликовано: 15.01.2020 Бюл. № 2

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 15.10.2015

(86) Заявка РСТ:  
US 2014/029109 (14.03.2014)

(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2014/144622 (18.09.2014)

Адрес для переписки:  
197101, Санкт-Петербург, а/я 128, "АРС-  
ПАТЕНТ"

(72) Автор(ы):

ФОРМЭН Стивен (US),  
МАРДАЙРОС Армен (US)

(73) Патентообладатель(и):  
Сити оф Хоуп (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: WO 2012079000 A1, 14.06.2012. US  
2013004514 A1 US2013004514, 03.01.2013. РОЙТ  
А. и др., Иммунология, пер. с англ. - М.: Мир,  
2000, стр.10-13. ЕА 9873 В1, 28.04.2008.

(54) Т-КЛЕТКИ, ПЕРЕНАЦЕЛЕННЫЕ В ОТНОШЕНИИ CD123-СПЕЦИФИЧНОГО ХИМЕРНОГО  
АНТИГЕННОГО РЕЦЕПТОРА, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к химерным антигенным рецепторам, нацеленным на CD123 (CD123CAR), и может быть использовано в медицине для лечения острого миелоидного лейкоза (AML). Конструируют молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CD123CAR, включающий: анти-CD123-scFv-область; шарнирную область IgG4 с SEQ ID NO: 13 с заменами N79Q и L17E и необязательно S10P; трансмембранный домен; костимуляторный

сигнальный домен CD27, CD28, 4-1BB или OX40; и сигнальный домен дзета-цепи Т-клеточного рецептора. При экспрессии в Т-клетках (CD4/CD8) от здоровых доноров CD123CAR перенацеливают Т-клеточную специфичность и опосредуют мощную эффекторную активность в отношении клеточных линий CD123<sup>+</sup>, а также первичных образцов от пациентов с AML. Кроме того, Т-клетки, полученные от пациентов с активным AML, могут быть модифицированы для экспрессии генов CD123CAR и способны

лизировать аутологичные AML-бласты in vitro.  
Наконец, одна доза  $5,0 \times 10^6$  CAR123-T-клеток  
приводит к значительной задержке лейкемической

прогрессии у мышей, что позволяет использовать  
CD123CAR-трансдуцированные Т-клетки в  
иммунотерапии для лечения высокого риска AML.  
5 н. и 17 з.п. ф-лы, 16 ил., 1 табл., 2 пр.

R U 2 7 1 1 1 1 4 C 2

R U 2 7 1 1 1 1 4 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C07K 14/705* (2006.01)  
*C12N 5/0783* (2010.01)  
*C12N 5/10* (2006.01)  
*A61K 35/17* (2015.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

## (12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

*A61K 35/17* (2019.08); *C07K 14/7051* (2019.08); *C07K 16/2866* (2019.08); *A61K 2039/505* (2019.08); *C07K 2317/622* (2019.08); *C07K 2319/00* (2019.08)

(21)(22) Application: **2015140624**, **14.03.2014**

(24) Effective date for property rights:  
**14.03.2014**

Registration date:  
**15.01.2020**

Priority:

(30) Convention priority:  
**15.03.2013 US 13/844,048**

(43) Application published: **26.04.2017** Bull. № 12

(45) Date of publication: **15.01.2020** Bull. № 2

(85) Commencement of national phase: **15.10.2015**

(86) PCT application:  
**US 2014/029109** (14.03.2014)

(87) PCT publication:  
**WO 2014/144622** (18.09.2014)

Mail address:  
**197101, Sankt-Peterburg, a/ya 128, "ARS-  
PATENT"**

(72) Inventor(s):

**FORMEN Stiven (US),  
MARDAJROS Armen (US)**

(73) Proprietor(s):

**Siti of Khoup (US)**

(54) **T CELLS RE-TARGETED WITH RESPECT TO CD123-SPECIFIC CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR, AND METHODS FOR USE THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology, specifically to chimeric antigenic receptors aimed at CD123 (CD123CAR). Constructing a nucleic acid molecule encoding CD123CAR, including: anti-CD123-scFv-region; a hinge region of IgG4 with SEQ ID NO: 13 with N79Q and L17E replacements and optionally S10P; transmembrane domain; costimulatory signal domain CD27, CD28, 4-1BB or OX40; and the T-cell receptor zeta chain signal domain. When T-cells (CD4/CD8) from normal CD123CAR donors are expressed, T-cell specificity is

re-targeted and powerful effector activity is mediated in relation to CD123 cell lines<sup>+</sup>, as well as primary samples from AML patients. Besides, T-cells obtained from patients with active AML can be modified for expression of CD123CAR genes and capable of lysing autologous AML-blasts in vitro. Finally, one dose  $5.0 \times 10^6$  CAR123-T-cells results in considerable delay of leukaemia progression in mice that allows using CD123CAR-transduced T-cells in immunotherapy for treating high AML risk.

EFFECT: invention can be used in medicine for treating acute myeloid leukemia (AML).

R U 2 7 1 1 1 4 C 2

R U 2 7 1 1 1 4 C 2



## Притязание на приоритет

[0001] Эта заявка испрашивает приоритет патентной заявки США №13/844048, поданной 15 марта 2013 года, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, включая графические материалы.

## Государственный интерес

[0002] Данное изобретение было сделано при поддержке правительства грантами NIH P50 CA107399, P01 CA030206 и M01 RR0004. Правительство имеет определенные права на данное изобретение.

## Предшествующий уровень техники

[0003] Острый миелоидный лейкоз (acute myeloid leukemia, AML) представляет собой заболевание, характеризующееся быстрой пролиферацией незрелых миелоидных клеток в костном мозге, что приводит к нефункциональному гемопоэзу [1]. Подходы к лечению острого миелоидного лейкоза (AML) первой линии оставались практически без изменений в течение почти 50 лет, и AML остается заболеванием с плохим прогнозом. Хотя стандартная индукционная химиотерапия может индуцировать полную ремиссию, у многих пациентов в конечном итоге развиваются рецидивы, и они умирают от этого заболевания [2]. Таким образом, разработка новых терапевтических средств для лечения AML имеет решающее значение.

[0004] Аллогенная трансплантация гемопоэтических клеток позволяет достичь излечения заболевания у отдельных пациентов и подчеркивает восприимчивость AML к иммунотерапии донорского происхождения. Кроме того, альфа-цепь рецептора интерлейкина 3 (CD123) была идентифицирована как потенциальная иммунотерапевтическая мишень, так как она сверхэкспрессируется при AML по сравнению с нормальными гемопоэтическими стволовыми клетками.

[0005] Последние достижения в иммунофенотипировании AML-клеток выявили несколько AML-связанных антигенов клеточной поверхности, которые могут выступать в качестве мишеней для будущих терапевтических препаратов [3]. Действительно, были описаны доклинические исследования с использованием антител, нацеленных на CD44, CD47, Т-клеточный иммуноглобулин-муцин-3 (TIM-3) и альфа-цепь рецептора интерлейкина 3 (IL-3R $\alpha$ ; CD123), для лечения AML, и они продемонстрировали перспективную противолейкемическую активность на мышинных моделях [3, 4]. CD123 экспрессируется на различных злокачественных опухолях, включая острый и хронический миелоидный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, В-клеточный острый лимфобластный лейкоз и новообразования из бластных плазмцитоподобных дендритных клеток. Кроме того, CD123, как правило, не экспрессируется на нормальных гемопоэтических стволовых клетках, благодаря чему CD123 является идеальной иммунотерапевтической мишенью. Кроме того, были завершены два испытания CD123-специфичных терапевтических препаратов в I фазе, при этом оба препарата продемонстрировали хороший профиль безопасности (ClinicalTrials.gov ID: NCT00401739 и NCT00397579). К сожалению, эти препараты, нацеленные на CD123, имели ограниченную эффективность, подтверждая, что альтернативные и более мощные лекарственные препараты, нацеленные против CD123, могут потребоваться для соблюдения противолейкемической активности.

[0006] Возможным более мощным альтернативным терапевтическим средством для лечения AML является применение Т-клеток, экспрессирующих химерные антигенные рецепторы (chimeric antigen receptor, CAR), которые перенацеливают Т-клеточную специфичность в отношении опухолеспецифических антигенов (tumor associated antigen, ТАА) клеточной поверхности МНС-независимым способом [5]. В большинстве случаев

CAR включают одноцепочечный вариабельный фрагмент (single-chain variable fragment, scFv) из моноклонального антитела, слитый с сигнальным доменом CD3 $\zeta$ , и могут включать костимуляторный эндодомен [5]. Несколько групп разработали CAR, нацеленные на различные антигены, для лечения В-клеточных злокачественных новообразований [6-10], и многие продолжают оценивать CAR-экспрессирующие Т-клетки в I фазе клинических испытаний [11-15]. Напротив, CAR-инженерные Т-клетки для лечения AML остаются редкими [16, 17].

[0007] Хотя современные режимы лечения AML позволяют достичь у некоторых пациентов полного ответа, у многих из них в конечном итоге развиваются рецидивы, что подчеркивает необходимость новых терапевтических средств, которые смогут привести к более стойким ответам. В настоящее время разрабатываются различные иммунотерапевтические средства, нацеленные на AML, в том числе антиген-специфические цитотоксические Т-лимфоциты, аллореактивные натуральные киллеры и вакцины на основе дендритных клеток. Например, Ока и его коллеги показали, что вакцинация пептидом 1 опухоли Вильмса может привести к клиническому и иммунологическому ответу у пациентов с AML [33]. Тем не менее, эти нацеленные терапевтические средства являются HLA-зависимыми. Поэтому желательно было бы разработать нацеленный терапевтический агент, например, CAR, который может перенацеливать Т-клеточную специфичность для селективного воздействия на AML-клетки HLA-независимым образом.

#### Краткое описание изобретения

[0008] Семейство химерных антигенных рецепторов (CAR), содержащих CD123-специфичный scFv, было разработано для нацеливания на различные эпитопы на CD123. В некоторых воплощениях такой ген химерного антигенного рецептора CD123 (CD123CAR) включает анти-CD123-scFv-область, слитую в рамке считывания с модифицированной шарнирной областью IgG4, содержащей изменение в спейсерной области IgG4, которое устраняет Fc-рецепторное связывание. В одном воплощении модифицированная шарнирная область IgG4 включает замену S228P, замену L235E и, возможно, замену N297Q. Ген CD123CAR также включает по меньшей мере один костимуляторный сигнальный домен; а также сигнальный домен дзета-цепи Т-клеточного рецептора (T cell receptor, TCR). В некоторых воплощениях ген CD123CAR включает нуклеотидную последовательность, выбранную среди SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4. В других воплощениях ген CD123CAR кодирует аминокислотную последовательность, которая включает SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12.

[0009] В соответствии с воплощениями, описанными ниже, гены CD123CAR могут быть частью экспрессионной кассеты, которая вставлена в вектор (например, в вирусный вектор). Таким образом, популяция человеческих Т-клеток может быть трансдуцирована вектором, в результате чего Т-клетки экспрессируют гены CD123CAR. При экспрессии в здоровых донорских Т-клетках (CD4/CD8) CD123CAR перенацеливают Т-клеточную специфичность и опосредованную мощную эффекторную активность в отношении клеточных линий CD123<sup>+</sup>, а также первичных образцов от пациентов с AML. CD123CAR-Т-клетки существенно не изменяют образование колоний гранулоцитов/макрофагов и эритроидных колоний *in vitro*, подтверждая дифференциальный эффект на AML-клетки в отличие от клеток иммунной системы.

[0010] Кроме того, Т-клетки, полученные от пациентов с активным AML, могут быть модифицированы для экспрессии генов CD123CAR и способны лизировать аутологичные AML-бласты *in vitro*. Эти результаты подтверждают, что CD123CAR-трансдуцированные

Т-клетки могут быть использованы в качестве иммунотерапии для лечения высокого риска AML. Таким образом, согласно некоторым воплощениям предусмотрены способы лечения AML у субъекта, где такие способы включают этап введения субъекту первой популяции Т-клеток, трансдуцированных первым геном CD123CAR. Способы также могут включать дополнительный этап введения субъекту первой популяции Т-клеток, трансфицированных первым геном CD123CAR, в комбинации со второй популяцией Т-клеток, трансдуцированных вторым геном CD123CAR. В некоторых воплощениях первый ген CD123CAR включает нуклеотидную последовательность, выбранную среди SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4. Второй ген CD123CAR также может включать нуклеотидную последовательность, выбранную среди SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4, тем не менее, нуклеотидная последовательность второго гена CD123CAR может не быть такой же, как выбранная для первого гена CD123CAR. Это приводит к комбинированному лечению AML с использованием двух или более чем двух различных популяций Т-клеток, трансдуцированных CD123CAR, которые могут вызвать синергический эффект по сравнению с использованием одной популяции Т-клеток, трансдуцированных CD123CAR.

Краткое описание графических материалов

[0011] На фиг. 1 показано, что CD123-специфичные CAR могут быть экспрессированы в человеческих Т-клетках от здорового донора. (А) Схема CAR, содержащего модифицированную шарнирную область IgG4, модифицированный трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домен CD28 и сигнальный домен CD3 $\zeta$ . Также указана последовательность рибосомального проскока T2A и маркер трансдукции укороченный EGFR (рецептора эпидермального фактора роста, EGFRt). (В) Репрезентативный фенотип ложно-трансдуцированных и трансдуцированных лентивирусом Т-клеток, полученных от одного здорового донора. После иммуномагнитной селекции и одного цикла размножения CAR-модифицированные Т-клетки метили биотинилированным анти-Fc-антителом или биотинилированным анти-EGFR-антителом, а затем PE-конъюгированным стрептавидином и анти-TCR $\alpha/\beta$ , анти-CD4 или анти-CD8 и анализировали путем проточной цитометрии. Расположение по квадрантам основано на мечении изотипических контролей, и указан процент клеток, попадающих в каждый квадрант. (С) Экспрессия указанных маркеров клеточной поверхности на Т-клеточных линиях от трех различных здоровых доноров с последующей иммуномагнитной селекцией и одним циклом размножения. Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SEM.

[0012] На фиг. 2 показано, что CD123-специфичные CAR-экспрессирующие Т-клетки лизируют CD123-экспрессирующие опухолевые клеточные линии. (А) Проточная цитометрия клеток 293Т, временно трансфицированных для экспрессии CD123 (наверху, черная линия) или CD19 (внизу, черная линия). Исходные ложно-трансдуцированные 293Т-клетки метили либо анти-CD123-, либо анти-CD19-антителом (серая заштрихованная, наверху и внизу), чтобы определить фоновые уровни экспрессии. (В) Специфическая цитотоксичность CD123-CAR-экспрессирующих Т-клеток (26292 и 32716) против 293Т-клеток, экспрессирующих либо CD123 (293Т-CD123), либо CD19 (CD19-293Т), в анализе высвобождения хрома. Данные представляют средние значения от трех лунок  $\pm$  SD. (С) Проточная цитометрия CD123 на линии AML-клеток KG1a, линии EBV-трансформированных LCL-клеток и линии CML-клеток K562. В каждой гистограмме указан процент клеток, положительных на CD123-окрашивание (черная линия), в сравнении с изотипическими контролями (серая заштрихованная). (D) Специфическая цитотоксичность CD123-CAR-Т-клеток (26292 и 32716) против клеточной

линии CD19<sup>+</sup>CD123<sup>+</sup> LCL и клеточной линии CD19<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup> KG1a в анализе высвобождения хрома. ОКТ3-экспрессирующие клеточные линии LCL (LCL-ОКТ3) и CD19<sup>-</sup>CD123<sup>-</sup> K562 были использованы в качестве положительной и отрицательной контрольных клеточных линий, соответственно. Данные представляют собой средние значения от трех лунок + SD.

[0013] На фиг. 3 показано, что CD123-специфичные Т-клетки высвобождают INF- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  и пролиферируют в ответ на CD123-экспрессирующие клетки-мишени. CD123-CAR-Т-клетки или контрольные парные Т-клетки от трех здоровых доноров культивировали совместно с указанными клеточными линиями в течение 24 часов в соотношении Е:Т=10:1, и высвобождение INF- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  количественно оценивали с помощью методики Luminex multiplex bead. (В) Парные CFSE-меченные CD19- или CD123-специфичные Т-клетки культивировали совместно с указанными стимуляторными клеточными линиями в течение 96 часов в соотношении Е:Т=2:1 и анализировали с помощью проточной цитометрии по разведению CFSE. Нестимулированные Т-клетки (заштрихованные гистограммы) использовали в качестве контролей базальной пролиферации Т-клеток.

[0014] На фиг. 4 показана активация множественных CD4 и CD8 эффекторных функций CD123-специфичными CAR с последующим совместным культивированием с первичными AML-образцами. Парные CAR-инженерные Т-клетки совместно культивировали в течение шести часов с тремя различными первичными образцами от пациентов с AML (AML 179, 373 и 605) и анализировали на наличие поверхностной экспрессии CD107a и внутриклеточной продукции INF- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ . (А, столбчатые диаграммы) Процент DAPI<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>EGFRt<sup>+</sup>-клеток, экспрессирующих CD107a. Данные представляют собой средние значения + S.D. (А, круговые диаграммы). Фракции CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>EGFRt<sup>+</sup>-клеток, подвергающихся дегрануляции и продуцирующие INF- $\gamma$  и/или TNF- $\alpha$ , нанесены на круговые диаграммы. (В) Данные популяции DAPI<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>EGFRt<sup>+</sup> из того же эксперимента, который описан в А и В. (С) Парные CFSE-меченные CD19- или CD123-специфичные Т-клетки культивировали совместно с указанными стимуляторными клетками в течение 72 часов в соотношении Е:Т=2:1 и анализировали с помощью проточной цитометрии по разведению CFSE в популяции DAPI<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>EGFRt<sup>+</sup>. Клеточные линии LCL и 562 служат положительными и отрицательными 27 контролями, соответственно. Пре-В-ALL 802 является первичным образцом от пациента, дважды положительным на CD19 и CD123. Расположение по квадрантам основано на нестимулированных Т-клетках.

[0015] На фиг. 5 показано, что первичные AML-клетки являются специфической мишенью CD123-специфичных Т-клеток. (А) Парные CD19- или CD123-специфичные Т-клетки в течение 4 часов культивировали совместно с <sup>51</sup>Cr-мечеными CD34<sup>+</sup> первичными AML-образцами в соотношении Е:Т=25:1. Клеточные линии LCL и K562 служат положительным и отрицательным контролем, соответственно. Пре-В-ALL 802 является первичным образцом от пациента, дважды положительным на CD19 и CD123. Данные представляют собой средние значения от трех лунок + S.D. (В) Специфический лизис AML-бластов в трех первичных образцах от пациентов с AML в (А). Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SEM. \*p<0,05 и \*\*p<0,0005 с помощью непарного t-теста Стьюдента, сравнивающего 26292 и 32716 с CD19R.

[0016] На фиг. 6 показано влияние CD123-CAR-экспрессирующих Т-клеток на нормальные и лейкоэмические клетки-предшественники in vitro. (А и В) Клетки пуповинной

крови CD34<sup>+</sup> (CB) (n=3) были CD34-иммуномагнитным образом выбраны и культивированы совместно либо с CD19-, либо с CD123-специфичными парными Т-клетками, либо только со средой (необработанные) в течение 4 часов в соотношении Е:Т=25:1. Затем клетки высевали в полутвердую метилцеллюлозную культуру предшественников на 14-18 дней и оценивали наличие гранулоцитарно-макрофагальных колониеобразующих единиц (granulocyte-macrophage colony forming unit, CFU-GM, A) и эритроидных единиц, образующих "взрывообразные" колонии (burst forming unit erythroid, BFU-E, B). Проценты нормированы по CD19-специфическим Т-клеточным контролям. Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SEM для трех различных образцов СВ. (C) CD34<sup>+</sup> первичные образцы от пациентов с AML (AML 493, 519 или 545) были иммуномагнитным образом выбраны и культивированы совместно либо с CD19-, либо с CD123-специфичными парными Т-клетками, либо только со средой (необработанные) в течение 4 часов в соотношении Е:Т=25:1. Затем клетки высевали в полутвердую метилцеллюлозную культуру предшественников на 14-18 дней и оценивали наличие лейкемических колониеобразующих единиц (CFU-L). Проценты нормированы по CD19-специфическим Т-клеточным контролям. Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SEM для трех различных первичных образцов от пациентов с AML. \*p<0,05 с помощью непарного t-теста Стьюдента, сравнивающего 26292 и 32716 с CD19R. (D) Комбинированное образование колоний СВ из (A) или AML-клеток из (C), обработанных CD123-нацеленной CAR-конструкцией (26292 или 32716), нормированное по CD19R. \*p<0,05 с помощью непарного t-теста Стьюдента.

[0017] На фиг. 7 показано, что CD123-CAR-перенацеленные Т-клетки, полученные от пациентов с AML, специфически лизируют аутологичные бласты in vitro. (A) Т-клетки от трех пациентов с AML были трансдуцированы лентивирусным вектором для экспрессии CAR CD19R, 26292 или 32716. Показаны Т-клеточные линии от AML 722 через 19 дней после трансдукции. (B) Экспрессия CD123 на клетках-мишенях, используемых в анализе высвобождения <sup>51</sup>Cr. Указан процент CD123<sup>+</sup>-клеток и индекс относительной флуоресценции (relative fluorescence index, RFI) каждого образца. (C) Результаты 4-часовых анализов аутологичного киллинга (уничтожения) с использованием Т-клеток, полученных из образцов от трех пациентов с AML, в качестве эффекторов и <sup>51</sup>Cr-меченных аутологичных CD34-обогащенных бластов в качестве клеток-мишеней. Данные представляют собой средние значения от трех лунок + S.D.

[0018] На фиг. 8 изменение размера опухоли показано путем биолюминесцентной визуализации мышей NSG, которым после введения линии AML-клеток KG1a, модифицированных для экспрессии люциферазы светлячка (день 5), в течение пяти дней вводили CD123CAR-трансдуцированные Т-клетки (26292), содержащие либо мутации S228P+L235E, либо мутации S228P+L235E+N297Q.

[0019] На фиг. 9 показана схема химерного антигенного рецептора (CAR), имеющего антиген-специфическую одноцепочечную Fv-область, шарнирную область, костимуляторный сигнальный домен и сигнальный домен дзета-цепи Т-клеточного рецептора в соответствии с некоторыми воплощениями (изображение из Urba WJ and Longo DL N Engl J Med 2011; 365: 754-757).

[0020] На фиг. 10 показана схема конструкции 32716CAR, имеющей мутацию L235E и мутацию S228P ("32716CAR(S228P+L235E)"), вместе с нуклеотидной последовательностью конструкции 32716CAR(S228P+L235E) (SEQ ID NO: 1 - антисмысловая нить (верхняя пронумерованная нить); SEQ ID NO: 5 - смысловая нить (нижняя непронумерованная нить)) и аминокислотной последовательностью

конструкции 32716CAR(S228P+L235E) (SEQ ID NO: 9) в соответствии с некоторыми воплощениями. Мутации выделены жирным шрифтом.

[0021] На фиг. 11 показана схема конструкции 26292CAR, имеющей мутацию L235E и мутацию S228P ("26292CAR(S228P+L235E)"), вместе с нуклеотидной последовательностью конструкции 26292CAR(S228P+L235E) (SEQ ID NO: 2 - антисмысловая нить (верхняя пронумерованная нить); SEQ ID NO: 6 - смысловая нить (нижняя непронумерованная нить)) и аминокислотной последовательностью конструкции 26292CAR(S228P+L235E) (SEQ ID NO: 10) в соответствии с некоторыми воплощениями. Мутации выделены жирным шрифтом.

[0022] На фиг. 12 показана схема конструкции 32716CAR, имеющей мутацию L235E, мутацию S228P и мутацию N297Q ("32716CAR(S228P+L235E+N297Q)"), вместе с нуклеотидной последовательностью конструкции 32716CAR(S228P+L235E+N297Q) (SEQ ID NO: 3 - антисмысловая нить (верхняя пронумерованная нить); SEQ ID NO: 7 - смысловая цепь (нижняя непронумерованная нить)) и аминокислотной последовательностью конструкции 32716CAR(S228P+L235E+N297Q) (SEQ ID NO: 11) в соответствии с некоторыми воплощениями. Мутации выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. Код основания R в IUPAC соответствует A или G, а код основания Y в IUPAC соответствует T или C.

[0023] На фиг. 13 показана схема конструкции 26292CAR, имеющей мутацию L235E, мутацию S228P и мутацию N297Q ("26292CAR(S228P+L235E+N297Q)"), вместе с нуклеотидной последовательностью конструкции 26292CAR(S228P+L235E+N297Q) (SEQ ID NO: 4 - антисмысловая нить (верхняя пронумерованная нить); SEQ ID NO: 8 - смысловая нить (нижняя непронумерованная нить)) и аминокислотной последовательностью конструкции 26292CAR(S228P+L235E+N297Q) (SEQ ID NO: 12) в соответствии с некоторыми воплощениями. Мутации выделены жирным шрифтом. Код основания R в IUPAC соответствует A или G, а код основания Y в IUPAC соответствует T или C.

[0024] На фиг. 14 показана экспрессия CD123 в первичных образцах AML и пуповинной крови. (A) Репрезентативный пример экспрессии CD123 на первичных AML-клетках. Клетки гейтировали по популяции DAPI<sup>+</sup>rod<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup> и оценивали экспрессию CD123 (черный - изотипический контроль, красный - анти-CD123). (B) Процент CD123-положительных клеток, экспрессированных в популяции DAPI<sup>+</sup>rod<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>. Каждая точка представляет собой отдельный образец. (C)

Относительный показатель флуоресценции (RFI) CD123 в популяции DAPI<sup>+</sup>rod<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>. RFI рассчитывается путем деления медианы анти-CD123-клеток на медиану меченых клеток изотипического контроля. (D) Наложение гистограмм экспрессии CD123 на клетках AML 605 (красный), AML 722 (синий) и образца пуповинной крови (серый). Изотипический контроль показан черным цветом.

[0025] На фиг. 15 показана стратегия гейтирования, используемая для исследования активации множественных эффекторных функций CD123-специфичными Т-клетками в ответ на инкубацию с первичными образцами от пациентов с AML. Стратегия гейтирования для полихроматической проточной цитометрии для определения Т-клеточных эффекторных функций показана для CD123-CAR- (на основе 26292) Т-клеток после совместного культивирования с AML 373. (A) Начальное гейтирование установлено на CD3<sup>+</sup>-клетки. (B) Вторичное гейтирование, установленное с помощью флуоресценции минус один контроль, установлено на EGFRt<sup>+</sup>-клетки. (C) Третичное

гейтирование установлено на CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-популяции. (D) Финальное гейтирование установлено на CD107a<sup>+</sup>-клетки. (E) Продукция IFN-γ и TNF-α в популяциями CD107a<sup>+</sup>. Квадранты установлены с помощью меченых образцов изотипического контроля. В

каждом квадранте отмечены проценты.

[0026] На фиг. 16 показано, что CFSE разводят в обеих популяциях, CD4 и CD8, CAR-экспрессирующих Т-клеток. Субпопуляции клеток CD4 (A) и CD8 (B) показаны на фиг. 5C. После первоначального гейтирования на DAPI<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>EGFRt<sup>+</sup>-клетки анализировали клетки CD4 и CD8 по разведению CFSE после совместного культивирования с

первичными образцами от пациентов с AML. Расположение по квадрантам основано на нестимулированных Т-клетках.

Подробное описание изобретения

[0027] Некоторые воплощения данного изобретения описаны подробно с помощью конкретных примеров, последовательностей и графических материалов. Перечисленные воплощения не предназначены для ограничения изобретения этими воплощениями, поскольку подразумевается, что изобретение охватывает все альтернативы, модификации и эквиваленты, которые могут быть включены в объем данного изобретения, определенный формулой изобретения. Специалисту в данной области будут очевидны многочисленные способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, которые могут быть использованы в осуществлении данного изобретения на практике.

[0028] В некоторых воплощениях предложен ген, кодирующий опухолеспецифический химерный антигенный рецептор (CAR). Согласно некоторым воплощениям этот ген кодирует CD123-специфичный CAR (CD123CAR). Ген CD123CAR включает

одноцепочечную анти-CD123-Fv-область (scFv) и один или более чем один из следующих доменов: шарнирную область, костимуляторный сигнальный домен, внутриклеточный сигнальный домен или их комбинацию.

[0029] В некоторых воплощениях ген CD123CAR может включать, но не ограничиваясь ими, одноцепочечную анти-CD123-Fv-область (scFv), шарнирную область,

возможно, по меньшей мере один костимуляторный сигнальный домен и, возможно, внутриклеточный сигнальный домен.

[0030] В некоторых воплощениях ген CD123CAR может включать, но не ограничиваясь ими, одноцепочечную анти-CD123-Fv-область (scFv), шарнирную область, по меньшей мере один костимуляторный сигнальный домен и внутриклеточный

сигнальный домен (фиг. 9).

[0031] Анти-CD123-scFv-область может включать нуклеотидную последовательность, которая при экспрессии может связывать эпитоп CD123. В некоторых воплощениях анти-CD123-scFv-область включает нуклеотид, который кодирует VH- и VL-домен рекомбинантных иммунотоксинов (recombinant immunotoxin, RIT) 26292 32716 и [18].

Ген CD123CAR, который нацелен на 26292, и ген CD123CAR, который нацелен на 32716, также упоминаются в данном документе как 26292CAR и 32716CAR, соответственно. В некоторых воплощениях анти-CD123-scFv-область может включать нуклеотидную последовательность, выбранную среди следующих:

нуклеотиды 82-814 из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 для 32716CAR; или

нуклеотиды 82-792 из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4 для 26292CAR.

[0032] Указанные нуклеотидные последовательности кодируют аминокислотные последовательности, выбранные среди следующих:

остатки 23-266 из SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11 при использовании в 32716CAR;

или

остатки 23-259 из SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12 при использовании в 26292CAR.

[0033] В некоторых воплощениях анти-CD123-scFv-область может быть

модифицирована для улучшения связывания или для снижения иммуногенности.

5 Например, в одном аспекте анти-CD123-scFv-область может быть гуманизированной анти-CD123-scFv-областью.

[0034] Шарнирная область может включать по меньшей мере часть иммуноглобулина (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), которая находится между доменами CH2-CH3. В некоторых воплощениях шарнирная область представляет собой модифицированную

10 шарнирную область. Модифицированная шарнирная область может иметь одну или более чем одну аминокислотную замену или модификацию, которая способствует снижению влияния CD123CAR "мимо мишени", тем самым увеличивая его специфичность и эффективность. Термины "аминокислотная модификация" или "аминокислотная замена" или "замена", используемые в данном документе, означают аминокислотную

15 замену, вставку и/или делецию в последовательности белка или пептида. Термины "аминокислотная замена" или "замена", используемые в данном документе, означают замену аминокислоты в определенной позиции в исходной пептидной или белковой последовательности на другую аминокислоту. Например, замена S228P относится к вариантному белку или пептиду, в котором серин в позиции 228 заменен пролином.

20 [0035] Аминокислотные замены могут быть получены путем мутации, например, конкретный кодон в нуклеиновокислотной последовательности, кодирующей белок или пептид, заменен на кодон, кодирующий другую аминокислоту. Такую мутацию, как правило, получают путем наименьшего из возможных нуклеотидных изменений. Замена такого рода может быть сделана для того, чтобы изменить аминокислоту в

25 образующемся белке неконсервативным образом (т.е. путем изменения кодона аминокислоты, принадлежащей к группе аминокислот, имеющих определенный размер или характеристику, на кодон аминокислоты, принадлежащей к другой группе) или консервативным образом (т.е., путем изменения кодона аминокислоты, принадлежащей к группе аминокислот, имеющих определенный размер или характеристику, на кодон

30 аминокислоты, принадлежащей к той же группе). Такая консервативная замена, как правило, приводит к меньшим изменениям в структуре и функции полученного белка.

[0036] Ниже приведены примеры различных групп аминокислот:

- Аминокислоты с неполярными R-группами: аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, триптофан, метионин

35 - Аминокислоты с незаряженными полярными R-группами: глицин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин, глутамин

- Аминокислоты с заряженными полярными R-группами (отрицательно заряженные при pH 6,0): аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота

40 - Основные аминокислоты (положительно заряженные при pH 6,0): лизин, аргинин, гистидин (при pH 6,0)

[0037] Другая группа может состоять из аминокислот с фенильными группами: фенилаланин, триптофан, тирозин.

[0038] Другое группирование может быть проведено в соответствии с молекулярной массой (т.е. размером R-групп), как показано ниже:

Глицин	75
Аланин	89
Серин	105
Пролин	115



	Валин	117
	Треонин	119
	Цистеин	121
	Лейцин	131
	Изолейцин	131
5	Аспарагин	132
	Аспарагиновая кислота	133
	Глутамин	146
	Лизин	146
	Глутаминовая кислота	147
	Метионин	149
10	Гистидин (при pH 6,0)	155
	Фенилаланин	165
	Аргинин	174
	Тирозин	181
	Триптофан	204

15 [0039] В некоторых воплощениях модифицированная шарнирная область получена из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 и включает один или более чем один аминокислотный остаток, замещенный аминокислотным остатком, отличающимся от присутствующего в немодифицированной шарнирной области. Один или более чем один замещенный аминокислотный остаток выбран среди одного или более чем одного из аминокислотных остатков в позициях: 220, 226, 228, 229, 230, 233, 234, 235, 234, 237, 238, 239, 243, 247, 267, 20 268, 280, 290, 292, 297, 298, 299, 300, 305, 309, 218, 326, 330, 331, 332, 333, 334, 336, 339 или их комбинаций, но не ограничиваясь ими.

[0040] В некоторых воплощениях модифицированная шарнирная область получена из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 и включает, но не ограничиваясь ими, одну или более чем 25 одну из следующих аминокислотных замен: C220S, C226S, S228P, C229S, P230S, E233P, V234A, L234V, L234F, L234A, L235A, L235E, G236A, G237A, P238S, S239D, F243L, P247I, S267E, H268Q, S280H, K290S, K290E, K290N, R292P, N297A, N297Q, S298A, S298G, S298D, S298V, T299A, Y300L, V305I, V309L, E318A, K326A, K326W, K326E, L328F, A330L, A330, A331S, P331S, I332E, E333A, E333S, E333S, K334A, A339D, A339Q, P396L или их комбинаций (50).

30 [0041] В некоторых воплощениях модифицированная шарнирная область получена из шарнирной области IgG4, имеющей следующую аминокислотную последовательность:

Позиция 219 ESKYGPCCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY Позиция 279 VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV 35 LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK Позиция 339

AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL Позиция 399 DSDGSFFLYS LTVDKSRWQ EGNVFSQSVN HEALHNNHYTQ KSLSLSLGK (SEQ ID NO: 13)

40 [0042] В некоторых воплощениях модифицированная шарнирная область получена из IgG4 и включает один или более чем один аминокислотный остаток, замещенный на аминокислотный остаток, отличающийся от присутствующего в немодифицированной шарнирной области. Один или более чем один замещенный аминокислотный остаток выбран среди одного или более чем одного из аминокислотных остатков в позициях: 220, 226, 228, 229, 230, 233, 234, 235, 234, 237, 238, 239, 243, 247, 267, 268, 280, 290, 292, 297, 298, 299, 300, 305, 309, 218, 326, 330, 331, 332, 333, 334, 336, 339 или их комбинаций, 45 но не ограничиваясь ими.

[0043] В некоторых воплощениях модифицированная шарнирная область получена из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 и включает, но не ограничиваясь ими, одну или более чем одну из следующих аминокислотных замен: 220S, 226S, 228P, 229S, 230S, 233P, 234A,

234V, 234F, 234A, 235a, 235E, 236A, 237A, 238S, 239D, 243L, 247I, 267E, 268Q, 280H, 290S, 290E, 290N, 292P, 297A, 297Q, 298A, 298g, 298D, 298V, 299A, 300L, 305I, 309L, 318A, 326A, 326W, 326E, 328F, 330L, 330S, 331S, 331S, 332E, 333A, 333S, 333S, 334a, 339D, 339Q, 396L или их комбинаций, где аминокислота в немодифицированной шарнирной области

5 замещена указанными выше аминокислотами в указанной позиции.

[0044] В некоторых воплощениях модифицированная шарнирная область IgG4 включает, но не ограничиваясь ими, замену серина (S) на пролин (P) в позиции 228 (S228P), замену глутаминовой кислоты (E) на лейцин (L) в позиции 235 (L235E), замену глутамина (Q) на аспарагин (N) в позиции 297 (N297Q). В некоторых воплощениях

10 модифицированная шарнирная область IgG4 может включать нуклеотидную последовательность, выбранную среди следующих:

нуклеотиды 814-1500 из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 для 32716CAR; или нуклеотиды 793-1479 из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4 для 26292CAR.

[0045] Указанные нуклеотидные последовательности кодируют аминокислотные

15 последовательности, выбранные среди следующих:

остатки 267-495 из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 при использовании в 32716CAR; или

остатки 260-488 из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4 при использовании в 26292CAR.

[0046] В одном воплощении модифицированная шарнирная область IgG4 включает

20 замену S228P и замену L235E ("S228P+L235E") (см. фиг. 10 и 11). В другом воплощении модифицированная шарнирная область IgG4 включает замену S228P, замену L235E и замену N297Q ("S228P+L235E+N297Q") (см. фиг. 12 и 13).

[0047] В некоторых воплощениях шарнирная область может быть модифицирована путем замены Fc-спейсерной области в C123CAR на спейсер, не способный к Fc-

25 связыванию, например, на шарнирную область CD8a. Альтернативно, Fc-спейсер шарнирной области может быть удален. Такие замены будут уменьшать или устранять Fc-связывание.

[0048] Термин "позиция", используемый в данном документе, представляет

30 расположение в последовательности белка. Позиции могут быть пронумерованы последовательно или в соответствии с утвержденным форматом, например, позиция по Kabat, или позиция по ЕС, или индекс ЕС по Kabat. Для всех позиций, обсуждаемых в данном документе, нумерация осуществляется в соответствии с индексом ЕС или схемой нумерации ЕС (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, полностью

35 включен в данный документ посредством ссылки). Индекс ЕС, или индекс ЕС по Kabat, или схема нумерации ЕС, относится к нумерации антитела по ЕС (Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63: 78-85, полностью включен в данный документ посредством ссылки). Позиции по Kabat, хорошо известные в данной области, могут отличаться от позиций по ЕС для данной позиции. Например, замены S228P и L235E, описанные выше,

40 относятся к позициям по ЕС. Тем не менее, эти замены могут также соответствовать позициям по Kabat 241 (S241P) и 248 (L248E) [21].

[0049] Костимуляторный сигнальный домен может включать любой подходящий костимуляторный домен, включая, но не ограничиваясь ими, костимуляторный домен 4-1BB, костимуляторный домен OX-40, костимуляторный домен CD27 или

45 костимуляторный домен CD28. В соответствии с воплощениями, описанными в данном документе, CD123CAR может включать по меньшей мере один костимуляторный сигнальный домен. В одном аспекте CD123CAR имеет один костимуляторный сигнальный домен, или он может включать два или более двух костимуляторных

сигнальных доменов, таких как описанные выше. В другом аспекте костимуляторный домен может быть составлен из одного костимуляторного домена, такого как описанные выше, или, альтернативно, он может быть составлен из двух или более чем двух костимуляторных доменов в двух или более позициях. Альтернативно, в некоторых воплощениях CD123CAR не включает костимуляторный сигнальный домен.

[0050] В одном воплощении CD123CAR включает костимуляторный сигнальный домен, который является костимуляторным доменом CD28. Сигнальный домен CD28 может включать модифицированный трансмембранный домен CD28. В одном воплощении такой модифицированный трансмембранный домен CD28 имеет одну или более чем одну аминокислотную замену или модификацию, включая, но не ограничиваясь ими, замену лейцина-лейцина (LL) на глицин-глицин (GG) в аминокислотных остатках 530-531 из SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12; или остатках 523-524 из SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 13 (например, RLLH → RGGH [22]). В некоторых воплощениях модифицированный костимуляторный сигнальный домен может включать нуклеотидную последовательность, выбранную среди следующих:

нуклеотиды 1501-1707 из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 для 32716CAR; или нуклеотиды 1480-1686 из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4 для 26292CAR.

[0051] Указанные нуклеотидные последовательности кодируют аминокислотные последовательности, выбранные среди следующих:

остатки 498-564 из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 при использовании в 32716CAR; или

остатки 489-557 из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4 при использовании в 26292CAR.

[0052] Внутриклеточный сигнальный домен может включать любой подходящий Т-клеточный рецепторный (TCR) комплекс, часть его сигнального домена. В некоторых воплощениях внутриклеточный сигнальный домен является сигнальным доменом дзета-цепи (цепи ζ) TCR. В некоторых воплощениях сигнальный домен ζ-цепи может включать нуклеотидную последовательность, выбранную среди следующих:

нуклеотиды 1717-2052 из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 для 32716CAR; или нуклеотиды 1696-2031 из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4 для 26292CAR.

[0053] Указанные нуклеотидные последовательности кодируют аминокислотные последовательности, выбранные среди следующих:

остатки 568-679 из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 при использовании в 32716CAR; остатки 561-672 из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4 при использовании в 26292CAR.

[0054] Таким образом, в соответствии с воплощениями, описанными выше, ген CD123CAR может включать нуклеотидную последовательность, выбранную среди SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4. В других воплощениях ген CD123CAR может кодировать аминокислотную последовательность, выбранную среди SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12 (фиг. 10, 11, 12, 13).

Экспрессия генов CD123CAR и трансдукция Т-клеток

[0055] В некоторых воплощениях ген CD123CAR является частью экспрессионной кассеты. В некоторых воплощениях экспрессионная кассета может - в дополнение к гену CD123CAR - также включать вспомогательный ген. При экспрессии Т-клеткой вспомогательный ген может служить маркером селекции трансдуцированных Т-клеток, маркером отслеживания *in vivo* или суицидным геном для трансдуцированных Т-клеток.

[0056] В некоторых воплощениях вспомогательный ген представляет собой ген усеченного EGFR (EGFRt). EGFRt может быть использован в качестве неиммуногенного инструмента селекции (например, иммуномагнитной селекции с использованием биотинилированного цетуксимаба в комбинации с анти-биотиновыми микрогранулами

для обогащения Т-клеток, которые были трансдуцированы лентивирусными конструкциями, содержащими EGFRt), маркера для отслеживания (например, анализа путем проточной цитометрии для отслеживания приживления Т-клеток) и суицидного гена (например, с помощью Цетуксимаб/Эрбитукс®-опосредованной антителозависимой цитотоксичности (antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC)). Пример гена усеченного EGFR (EGFRt), который может быть использован в соответствии с воплощениями, описанными в данном документе, описан в международной патентной заявке PCT/US2010/055329, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки, как если бы она полностью была изложена в данном документе. В других воплощениях вспомогательный ген представляет собой ген усеченного CD19 (CD19t).

[0057] В другом воплощении вспомогательный ген представляет собой индуцируемый суицидный ген. Суицидный ген представляет собой рекомбинантный ген, который вызывает у клеток, экспрессирующих этот ген, запрограммированную клеточную гибель или опосредованный антителами вывод в заданное время. В одном воплощении индуцируемый суицидный ген, который может быть использован в качестве вспомогательного гена, представляет собой индуцируемый ген каспазы 9 (см. Straathof et al. (2005) An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. Blood. June 1; 105(11): 4247-4254, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки, как если бы она была полностью изложена в данном документе).

[0058] В некоторых воплощениях экспрессионная кассета, которая включает ген CD123CAR, описанный выше, может быть встроена в вектор для доставки - путем трансдукции или трансфекции - в клетку-мишень. Может быть использован любой подходящий вектор, например, бактериальный вектор, вирусный вектор или плаزمид. В некоторых воплощениях вектор представляет собой вирусный вектор, выбранный среди ретровирусного вектора, лентивирусного вектора, поксвирусного вектора, аденовирусного вектора или аденоассоциированного вирусного вектора. В некоторых воплощениях вектор может трансдуцировать популяцию здоровых Т-клеток. Успешно трансдуцированные или трансфицированные клетки-мишени экспрессируют один или более чем один ген, который является частью экспрессионной кассеты.

[0059] Таким образом, одна или более чем одна популяция Т-клеток может быть трансдуцирована геном CD123CAR. В некоторых воплощениях ген CD123CAR включает нуклеотидную последовательность, выбранную среди SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4. Соответственно, в некоторых воплощениях трансдуцированные Т-клетки экспрессируют ген CD123CAR, который кодирует аминокислотную последовательность, выбранную среди SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12 (фиг. 10, 11, 12, 13). Трансдуцированные Т-клетки могут быть получены от донора или могут быть получены от субъекта, имеющего AML и нуждающегося в лечении AML. В некоторых воплощениях трансдуцированные Т-клетки используются в адоптивной иммунотерапии для лечения AML.

[0060] Кроме того, одна или более чем одна популяция Т-клеток может быть частью фармацевтически приемлемой композиции для доставки для введения субъекту. В дополнение к CD123CAR-трансдуцированным Т-клеткам фармацевтически эффективная композиция может включать один или более чем один фармацевтически эффективный носитель. Термин "фармацевтически приемлемый носитель", используемый в данном документе, относится к фармацевтически приемлемому материалу, композиции или носителю, которые участвуют в реализации или транспортировке лекарственного агента, представляющего интерес, из одной ткани, органа или части тела в другую ткань, орган или часть тела. Такой носитель может содержать, например, жидкий,

твердый или полутвердый наполнитель, растворитель, поверхностно-активный агент, разбавитель, эксципиент, адъювант, связующий агент, буфер, агент, способствующий растворению, растворитель, материал для инкапсулирования, секвестрант (изолирующий агент), диспергирующий агент, консервант, смазку, разрыхлитель, загуститель, эмульгатор, противомикробный агент, антиоксидант, стабилизирующий агент, краситель или какую-либо их комбинацию.

[0061] Каждый компонент носителя является "фармацевтически приемлемый" в том смысле, что он должен быть совместимым с другими ингредиентами композиции и должен быть пригоден для контакта с какой-либо тканью, органом или частью тела, с которой он может встретиться, и это означает, что он не должен нести риска токсичности, раздражения, аллергической реакции, иммуногенности или любого другого осложнения, которое чрезмерно превышает его терапевтический эффект.

[0062] Некоторые примеры материалов, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают: (1) сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; (2) крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; (3) целлюлозу и ее производные, такие как натрий-карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; (4) порошкообразный трагакант; (5) солод; (6) природные полимеры, такие как желатин, коллаген, фибрин, фибриноген, ламинин, декорин, гиалуроновая кислота, альгинат и хитозан; (7) тальк; (8) эксципиенты, такие как масло какао и воски для суппозиторий; (9) масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; (10) гликоли, такие как пропиленгликоль; (11) полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; (12) сложные эфиры, такие как триметилен карбонат, этилолеат и этиллаурат; (13) агар; (14) буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; (15) альгиновую кислоту (или альгинат); (16) апирогенную воду; (17) изотонический раствор; (18) раствор Рингера; (19) спирт, такой как этиловый спирт и пропановый спирт; (20) фосфат-буферные растворы; (21) термопласты, такие как полимолочная кислота, полигликолевая кислота, (22) полиэфиры, такие как поликапролактон; (23) самоорганизующиеся пептиды; и (24) другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах, такие как ацетон.

[0063] Фармацевтические композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для физиологических условий, такие как агенты для подведения pH и буферные агенты, агенты для регуляции токсичности и т.п., например, ацетат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция, лактат натрия и т.п.

[0064] В одном воплощении фармацевтически приемлемый носитель представляет собой водный носитель, например забуференный физиологический раствор и т.п. В некоторых воплощениях фармацевтически приемлемый носитель представляет собой полярный растворитель, например ацетон и спирт.

[0065] Концентрация CD123CAR-трансдуцированных Т-клеток в этих составах может широко варьировать и будет выбрана в первую очередь на основании объема жидкости, вязкости, размера органа, массы тела и т.п. в соответствии с конкретным выбранным способом введения и потребностями биологической системы.

[0066] В некоторых воплощениях популяции Т-клеток, трансдуцированных геном CD124CAR (т.е. CD124CAR-трансдуцированные Т-клетки), такие как описанные в данном документе клетки, используемые в способах нацеливания и уничтожения AML-клеток, могут быть выращены в культуре клеток. В некоторых аспектах этого

воплощения способ может быть использован *in vitro* или в условиях исследования для изучения роли CD123 в этиологии AML или для оценки нацеливающих способностей новых CD123CAR-конструкций.

Лечение AML с помощью CD123CAR-трансдуцированных Т-клеток

5 [0067] В соответствии с некоторыми воплощениями гены CD123CAR и популяции Т-клеток, которые трансдуцированы генами CD123CAR, такие как описаны выше, могут быть использованы в способах лечения AML у субъекта. Такие способы могут включать этап введения субъекту терапевтически эффективного количества по меньшей мере одной популяции Т-клеток, трансдуцированных по меньшей мере одним геном  
10 CD123CAR. В этих воплощениях популяция CD123CAR-трансдуцированных Т-клеток экспрессирует один или более чем один ген CD123CAR, такой как описанные выше. В некоторых воплощениях Т-клетки трансдуцированы и экспрессируют генную конструкцию 32716CAR (S228P+L235E+N297Q) (фиг. 12) или генную конструкцию 26292CAR (S228P+L235E+N297Q) (фиг. 13). Когда такие клетки вводят при адоптивной  
15 иммунотерапии, трансдуцированные Т-клетки специфически нацелены и лизируют CD123-экспрессирующие клетки (например, AML-клетки) *in vivo*, тем самым обеспечивая их терапевтический эффект по устранению раковых клеток. Как описано в приведенных ниже примерах, генные конструкции CD123CAR, имеющие мутации S228P и L235E в шарнирной области, обеспечивают достаточную защиту от эффектов "мимо мишени",  
20 давая достаточный ответ в культивируемых клетках *in vitro*. Тем не менее, эти данные не должны быть экстраполированы на эффект этих конструкций *in vivo*. Исследователи часто придают большое значение данным *in vitro* относительно переноса эффекта какой-либо терапии на данные *in vivo*. Иногда данные *in vitro* действительно совпадают с данными *in vivo*. Тем не менее, эта корреляция является непредсказуемой, потому как  
25 фиг. 8 показывает, что генные конструкции CD123CAR (S228P+L235E) (фиг. 10-11), которые показали высокоэффективный противоопухолевый эффект *in vitro*, не имеют таких же эффектов *in vivo*. Поэтому в шарнирной области была сделана дополнительная мутация (N297Q) для получения конструкций CD123CAR (S228P+L235E+N297Q). В отличие от генных конструкций CD123CAR (S228P+L235E) введение этих конструкций  
30 привело к значительному снижению лейкемической нагрузки.

[0068] Популяция или популяции Т-клеток, трансдуцированных геном или генами CD123CAR, которые могут быть использованы в соответствии с описанными здесь способами, могут быть введены с помощью любого подходящего пути введения, отдельно или как часть фармацевтической композиции. Путь введения может относиться  
35 к любому пути введения, известному в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, внутрочерепной, парентеральный или трансдермальный. "Парентеральный" относится к пути введения, который, как правило, связан с инъекцией, включая подглазничную, инфузию, внутриартериальную, внутрисуставную, внутрисердечную, внутрикожную, внутримышечную, внутрибрюшинную, внутрилегочную,  
40 интраспинальную, интрастернальную, интратекальную, внутриопухолевую, внутриматочную, внутривенную, субарахноидальную, субкапсулярную, подкожную, чрезслизистую или транстрахеальную. В некоторых воплощениях трансдуцированные Т-клетки вводят внутривенно или интратекально.

[0069] Термин "эффективное количество", используемый в данном документе,  
45 относится к количеству агента, соединения, лекарственного препарата или терапии, которое производит нужный эффект. Например, популяция клеток может контактировать с эффективным количеством агента, соединения, лекарственного препарата или терапии для изучения их влияния *in vitro* (например, на культуру клеток)

или для получения желаемого терапевтического эффекта *ex vivo* или *in vitro*. Эффективное количество агента, соединения, лекарственного препарата или терапии может быть использовано для получения у субъекта терапевтического эффекта, такого как профилактика или лечение целевого состояния, облегчение симптомов, связанных с состоянием, или получение желаемого физиологического эффекта. В таком случае эффективное количество соединения является "терапевтически эффективным количеством", "терапевтически эффективной концентрацией" или "терапевтически эффективной дозой". Точное эффективное количество или терапевтически эффективное количество представляет собой количество композиции, которое даст наиболее эффективные результаты в плане эффективности лечения у данного субъекта или в популяции клеток. Это количество будет варьировать в зависимости от целого ряда факторов, включая, но не ограничиваясь ими, характеристики соединения (включая активность, фармакокинетику, фармакодинамику и биодоступность), физиологическое состояние субъекта (включая возраст, пол, тип и стадию заболевания, общее физическое состояние, чувствительность к данной дозе и тип лекарства) или клеток, природу фармацевтически приемлемого носителя или носителей в составе, а также способ введения. Также эффективное или терапевтически эффективное количество может варьировать в зависимости от того, вводится ли соединение отдельно или в комбинации с другим соединением, лекарственным препаратом или другим терапевтическим способом или подходом к лечению. Специалисты в клинической и фармакологической области смогут определить эффективное количество или терапевтически эффективное количество путем стандартных экспериментов, а именно путем мониторинга реакции клетки или субъекта на введение соединения и подведение дозировки, соответственно.

Дополнительные указания см. в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21<sup>st</sup> Edition, Univ. of Sciences in Philadelphia (USIP), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2005, который включен в данный документ посредством ссылки, как если бы он был полностью изложен в данном документе. Агенты, соединения или способы лечения, которые могут быть использованы в эффективном количестве или терапевтически эффективном количестве для получения нужного эффекта в соответствии с воплощениями, описанными в данном документе, могут включать, но не ограничиваясь ими, ген CD123CAR, экспрессионную кассету, которая включает ген CD123CAR, вектор, который доставляет экспрессионную кассету, включающую ген CD123CAR, в клетку-мишень, такую как Т-клетка, и популяцию Т-клеток, трансдуцированных геном CD123CAR.

[0070] Термин "лечение" состояния может относиться к предотвращению состояния, замедлению начала или скорости развития состояния, снижению риска развития этого состояния, профилактике или замедлению развития симптомов, связанных с состоянием, уменьшению или прекращению проявления симптомов, связанных с состоянием, получению полной или частичной регрессии состояния или к какой-либо их комбинации. Лечение может также означать профилактическое лечение состояния.

[0071] Термин "субъект", используемый в данном документе, относится к человеку или животному, включая всех млекопитающих, таких как приматы (особенно высшие приматы), овцы, собаки, грызуны (например, мыши или крысы), морские свинки, козы, свиньи, кошки, кролики и коровы. В некоторых воплощениях субъектом является человек.

[0072] В некоторых воплощениях способы лечения AML могут включать этап введения терапевтически эффективного количества первой популяции Т-клеток, трансдуцированных первым геном CD123CAR, в комбинации с терапевтически

эффективным количеством второй популяции Т-клеток, трансдуцированных вторым геном CD123CAR.

[0073] В других воплощениях CD123CAR-трансдуцированные Т-клетки могут быть введены в комбинации с одним или более чем одним дополнительным противораковым терапевтическим подходом. Термины "в комбинации" или "в комбинации с", используемые в данном документе, означают "в ходе лечения" того же рака у того же субъекта с использованием двух или более агентов, лекарственных препаратов, терапевтических подходов, процедур, схем лечения, способов лечения или их комбинаций в любом порядке. Они включают одновременное введение, а также введение, разнесенное во времени на несколько дней. Такое комбинированное лечение также может включать более чем одно введение одного или более чем одного агента, терапевтического препарата, процедуры, схемы лечения и способа лечения. Кроме того, введение двух или более агентов, лекарственных препаратов, терапевтических подходов, процедур, схем лечения, способов лечения или их комбинация могут быть осуществлены одинаковыми или разными путями введения.

[0074] Дополнительные противораковые терапевтические подходы, которые могут быть использованы в соответствии со способами, описанными в данном документе, могут включать одну или более чем одну противораковую процедуру, способ лечения, противораковые лекарственные препараты или их комбинации. В некоторых воплощениях CD123CAR-трансдуцированные Т-клетки могут быть введены в комбинации с одной или более чем одной противораковой процедурой или лечебным подходом, включая, но не ограничиваясь ими, трансплантацию стволовых клеток (например, трансплантацию костного мозга или трансплантацию стволовых клеток периферической крови с использованием аллогенных стволовых клеток, аутологичных стволовых клеток; или немиелоаблативную трансплантацию), лучевую терапию или хирургическую резекцию. В других воплощениях CD123CAR-трансдуцированные Т-клетки могут быть введены в комбинации с одним или более чем одним противораковым терапевтическим подходом или лекарством, которые могут быть использованы для лечения AML, включая, но не ограничиваясь ими, химиотерапевтические и другие противораковые лекарственные препараты, иммунотерапевтические препараты, нацеленные терапевтические препараты или их комбинации.

[0075] Химиотерапевтические и другие противораковые препараты, которые могут быть введены в комбинации с CD123CAR-трансдуцированными Т-клетками в соответствии с воплощениями, описанными в данном документе, включают, но не ограничиваясь ими, полностью транс-ретиноевую кислоту (all-trans-retinoic acid, ATRA), триоксид мышьяка, антрациклиновые антибиотики и их фармацевтически приемлемые соли (например, доксорубицина гидрохлорид, даунорубицина гидрохлорид, идарубицин, митоксантрон), алкилирующие агенты (например, циклофосфамид, ларомустин), антиметаболические аналоги (цитарабин, 6-тиогуанин, 6-меркаптопурин, метотрексат), деметилирующие агенты (например, децитабин, 5-азациитидин), ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот (например, гидроксимочевина), ингибиторы топоизомеразы (например, этопозид), алкалоиды барвинка (например, сульфат винкристина) или их комбинации (например, "ADE", которая представляет собой комбинированную терапию, которая включает комбинацию цитарабина (Ara-C), даунорубицина гидрохлорида и этопозида).

[0076] Иммунотерапевтические средства, которые могут быть введены в комбинации с CD123CAR-трансдуцированными Т-клетками в соответствии с воплощениями, описанными в данном документе, включают, но не ограничиваясь ими,



иммуномодулирующие реагенты (например, ингибиторы STAT3, леналидомид) и терапевтические моноклональные антитела. Терапевтические моноклональные антитела могут быть сконструированы для нацеливания на (i) один или более чем один AML-антиген, включая, но не ограничиваясь ими, CD33 (например, гемтузумаб, линтузумаб), MUC1 (например, кантузумаб равтанзин, кливатузумаб тетраксетан, пемтумомаб); (ii) В-клеточный антиген (например, ритуксимаб, офатумумаб); или сосудистый модулятор, такой как VEGF или VEGFR (например, алацизумаб пегол, бевацизумаб, икрукумаб, рамуцирумаб, ранибизумаб).

[0077] Нацеленные терапевтические средства, которые могут быть введены в комбинации с CD123CAR-трансдуцированными Т-клетками в соответствии с воплощениями, описанными в данном документе, включают, но не ограничиваясь ими, ингибиторы тирозинкиназы (иматиниб, дазатиниб, нилотиниб, сунитиниб), ингибиторы фарнезилтрансферазы (например, типифарниб), ингибиторы FLT и ингибиторы c-Kit (или CD117) (иматиниб, дазатиниб, нилотиниб).

Пример 1: CD123CAR-трансдуцированные Т-клетки обладают высокой цитолитической активностью и множественными эффекторными функциями против AML in vitro

#### Материалы и методы

[0078] Клеточные линии. Если не указано иное, то все клеточные линии поддерживали в среде RPMI 1640 (Irvine Scientific) с добавлением 2 mM L-глутамина, 25 mM HEPES и 10% инактивированной нагреванием FCS (Hyclone), далее именуемой полной средой (complete medium, CM). Мононуклеарные клетки периферической крови (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) были трансформированы вирусом Эпштейна-Барр для получения лимфобластоидных клеточных линий (lymphoblastoid cell line, LCL), как описано ранее [19]. Клетки LCL-ОКТ3 экспрессируют мембранный ОКТ3 и растут в CM, дополненной 0,4 мг/мл гигромицина [20]. Клетки K562 были получены из ATCC и культивированы в соответствии с рекомендациями. Клетки KG1a (любезно предоставленные доктором Ravi Bhatia) поддерживали в IMDM (Irvine Scientific) с 25 mM HEPES, 4 mM L-глутамина (Irvine Scientific) и 20% FCS. Клетки 293T (подарок от Center for Biomedicine and Genetics at City of Hope) поддерживали в DMEM + 10% инактивированной нагреванием FCS.

[0079] Первичные образцы AML. Первичные образцы AML были получены из периферической крови пациентов (в данном документе они называются образцами AML ID №№179, 373, 493, 519, 545, 559, 605, 722 и 813). Характеристики образцов приведены в таблице 1 ниже.

[Таблица 1 на следующей странице]

Таблица 1. Характеристики первичных образцов AML.

ID AML-образца	Возраст/пол	Цитогенетика	Мутационный статус Flt3	Клинический статус	Тип образца	CD123 (RFI) <sup>a</sup>	CD123 % положит.
179	74/м	Промежуточная степень риска t(1;7), t(14;15)	Н.о.	Рецидив	ПК	428,32	99,22
373	47/м	Высокая степень риска Комплексные аномалии в 3 клеточных линиях	Н.о.	Рецидив	ПК	1052,83	99,66
493	46/ж	Промежуточная степень риска Трисомия 8	Н.о.	Рецидив	ПК	22,98	76,80
519	44/ж	del(17p), dis (11;17), клональная потеря TP53/17p13.1	Н.о.	Рецидив	ПК	63,18	97,40
545	58/м	Промежуточная степень риска t(3;6), del(7)	Н.о.	Неудачная попытка индукции	ПК	52,73	99,32
559	59/м	Комплексные аномалии, массивная гипердиплоидия	Отрицат.	Рецидив	Аферез	9,30	45,0
605	55/м	Норма	Отрицат.	Персистенция	ПК	58,48	99,91
722	22/м	Промежуточная степень риска t(14;21), del(9q)	Отрицат.	Нелеченый	ПК	33,53	92,74
813	48/ж	Комплексные аномалии, трисомия 8, трисомия 21	Н.о.	Нелеченый	ПК	37,19	90,93

<sup>a</sup>Индекс относительной флуоресценции (RFI) представляет собой отношение медианы 5F5-меченного сигнала к изотипическому контрольному штамму в популяции CD34\*

\*гейтированы по популяции CD34\*

Н.о. – не определено

ПК – периферическая кровь

[0080] Проточная цитометрия. Конъюгированные с флуорохромом изотипические контроли, анти-CD4, анти-CD8, анти-Т-клеточный рецептор  $\alpha\beta$  (TCR $\alpha\beta$ ), анти-CD123 (9F5), анти-CD34 (8G12) и анти-CD38 (HIT2) были приобретены у BD Biosciences. Биотинилированный анти-Fc был приобретен у Jackson ImmunoResearch Laboratories. Биотинилированный цетуксимаб (Эрбитукс) был приобретен в аптеке СОН и был описан ранее [20]. Биотинилированные анти-CD2, анти-CD3, анти-CD7, анти-CD10, анти-CD11b, анти-CD19, анти-CD33 и анти-CD235A были приобретены у eBioscience. Сбор данных проводили на FACSCalibur, LSRII (BD Biosciences) или MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec) и анализировали с помощью FCS Express, версия 3 (программное обеспечение De Novo Software).

[0081] Трансфекция клеток 293Т с помощью CD123. кДНК CD123 амплифицировали из CD123-pMD18-T (Sino Biological Inc.) путем полимеразной цепной реакции с использованием праймеров (CD123-F: 5'-ATAAGGCCTGCCGCCACCATGGTCCTCCTTTGGCTCACG-3' и CD123-R 5'-ATAGCTAGCTCAAGTTTTCTGCACGACCTGTACTTC-3'). ПЦР-продукт клонировали в рMGPac с использованием сайтов рестрикции StuI и NheI. Клетки 293Т трансфицировали с помощью Lipofectamine 2000 (Life Technologies) в соответствии с инструкциями производителя. Через 24 часа после трансфекции экспрессию CD123 подтверждали путем проточной цитометрии.

[0082] Создание лентивирусных векторов. Для создания CAR-конструкций, используемых в данном исследовании, оптимизированные по кодам последовательности ДНК, кодирующие цепи VH и VL, модифицированную шарнирную область IgG4 и модифицированный трансмембранный домен CD28 (RLLH→RGGH [22]), синтезировали (GENEART) и клонировали в CD19RCAR-T2AEGFRt\_epHIV7 [20] с помощью сайтов рестрикции NheI и RsrII, чтобы заменить CD19RCAR. Лентивирус получали путем трансфекции клеток 293Т лентивирусным вектором и упаковочными векторами pCMV-Rev2, pCHGP-2 и pCMV-G с помощью набора для трансфекции клеток млекопитающих CalPhos™ (Clontech). Эти CAR-конструкции 26292 и 32716 также упоминаются в данном документе как 26292CAR (S228P+L235E) или 26292CAR (S228P+L235E+N297Q) (фиг. 11 и 13) и 32716CAR (S228P+L235E) или 32716CAR (S228P+L235E+N297Q).

N297Q) (фиг. 10 и 12). Лентивирусные супернатанты собирали через 24, 48 и 72 часа после трансфекции и концентрировали путем ультрацентрифугирования.

[0083] Трансдукция РВМС от здоровых доноров и пациентов с AML.

Неидентифицированные РВМС получали от давших согласие здоровых доноров и пациентов согласно протоколам, утвержденным экспертным советом. Т-клетки от здоровых доноров активировали с помощью ОКТ3 (30 нг/мл) в СМ, дополняемой 3 раза в неделю 25 Ед/мл IL-2 и 0,5 нг/мл IL-15 (далее называемой также Т-клеточной средой). Через 72 часа после активации Т-клетки спинокулировали лентивирусом с MOI=3 путем центрифугирования в течение 30 минут при 800 g и 32°C. Экспрессию CAR анализировали путем проточной цитометрии через 12-14 дней после лентивирусной трансдукции. EGFRt-экспрессирующие Т-клетки обогащали, как описано ранее [20]. Т-клетки размножали в Т-клеточной среде с помощью способа быстрого размножения [23].

[0084] Для генетической модификации Т-клеток от пациентов с AML размороженные образцы периферической крови или продукты афереза стимулировали с помощью Dynabeads® Human T-Expander CD3/CD28 (Life Technologies) в соотношении 3:1 частицы : CD3<sup>+</sup>-клетки в Т-клеточной среде. Через 72 часа после стимуляции частицами клетки спинокулировали лентивирусом с MOI=3. Частицы удаляли через 9-14 дней после начальной стимуляции с помощью магнита DynaMag™-50 (Life Technologies) и Т-клетки поддерживали в Т-клеточной среде. CAR-экспрессирующие Т-клеточные линии, полученные от пациентов с AML, не выбирали иммуномагнитным способом до использования в киллинг-анализе.

[0085] Анализ пролиферации с CFSE. Т-клетки метили 0,5 мкМ сукцинимидиловым эфиром карбоксифлуоресцеина (carboxyfluorescein succinimidyl ester CFSE; Molecular Probes) в соответствии с инструкциями производителя. Меченые Т-клетки культивировали совместно со стимуляторными клетками в соотношении Е:Т=2:1 или без них в СМ, дополненной 10 Ед/мл IL-2. Через 72-96 часов клетки собирали и метили биотинилированным цетуксимабом, а также пропидия иодидом или DAPI, чтобы исключить из анализа мертвые клетки. Образцы анализировали путем проточной цитометрии, чтобы оценить пролиферацию живых EGFRt-положительных клеток, по разведению CFSE.

[0086] Анализ высвобождения хрома и анализ секреции цитокинов. Клетки-мишени метили в течение 1 часа <sup>51</sup>Cr (PerkinElmer), промывали пять раз и аликвотировали в трех повторях с 5×10<sup>3</sup> клеток/лунка с эффекторными клетками в различных соотношениях эффектора к мишени (Е:Т). После 4-часового совместного культивирования супернатанты собирали и измеряли радиоактивность с помощью гамма-счетчика или TopCount (PerkinElmer). Процент специфического лизиса рассчитывали, как описано ранее [24]. Продукцию цитокинов после 24-часового совместного культивирования при отношении Е:Т=10:1 измеряли, как описано ранее [25].

[0087] CD107a-дегрануляция и внутриклеточная продукция цитокинов. Т-клетки культивировали совместно с клетками-мишенями при Е:Т=2:1 в течение шести часов при 37°C в присутствии GolgiStop™ (BD Biosciences) и анти-CD107a-клона H4A3 или изотипического контрольного антитела. По завершении шестичасовой инкубации клетки собирали, промывали и окрашивали анти-CD3, CD4, CD8 и биотинилированным цетуксимабом с последующим вторичным окрашиванием PE-конъюгированным стрептавидином. Затем клетки фиксировали и пермеабелизовали (Cytotfix/Cytoperm™ BD Biosciences) в соответствии с инструкциями производителя и метили анти-IFN-γ (BD

Biosciences, клон B27) и анти-TNF- $\alpha$  (BD Biosciences, клон MAb11). Сбор данных проводили с использованием анализатора MACSQuant (Miltenyi Biotec), а анализ проводили с использованием FCS Express Version 3 (De Novo Software).

[0088] Анализ колониеобразующих клеток. CD34<sup>+</sup>-клетки из мононуклеарных клеток пуповинной крови (cord blood, CB) или первичных образцов AML были выбраны с помощью колонки для иммуномагнитного разделения (Miltenyi Biotec). 10<sup>3</sup> CD34<sup>+</sup>-CB-клеток совместно культивировали с 25×10<sup>3</sup> эффекторных клеток в течение 4 часов до посева на полутвердую метилцеллюлозную культуру предшественников в повторных лунках [26]. Через 14-18 дней пересчитывали гранулоцитарно-макрофагальные колониеобразующие единицы (CFU-GM) и эритроидные единицы, образующие "взрывообразные" колонии (BFU-E). Для AML-образцов 5×10<sup>3</sup> CD34<sup>+</sup>-AML-клеток совместно культивировали с 125×10<sup>3</sup> эффекторных клеток в течение 4 часов до посева на полутвердую метилцеллюлозную культуру предшественников в повторных лунках.

[0089] Статистический анализ. Статистический анализ проводили с использованием Graphpad Prism v5.04. Непарный t-тест Стьюдента использовали для выявления значимых различий между исследуемыми группами.

#### Результаты

#### Создание CD123CAR-экспрессирующих Т-клеток

[0090] Для перенацеливания Т-клеточной специфичности были разработаны лентивирусные векторы, кодирующие CD123 CAR. Каждый из CAR включает кодон-оптимизированные последовательности, кодирующие одну из двух CD123-специфичных scFv, 26292 и 32716 [18], соответственно. scFv слиты в рамке считывания с человеческой Fc-областью IgG4, костимуляторной областью CD28 и сигнальным доменом CD3 $\zeta$ . Сразу за последовательностью CAR следует последовательность рибосомального проскока T2A и маркер трансдукции - укороченный человеческий EGFR (EGFRt) (фиг. 1A). ОКТ3-стимулированные PBMC от здоровых доноров трансдуцировали лентивирусным вектором, и CAR-экспрессирующие Т-клетки выделяли путем иммуномагнитной селекции с использованием биотинилированного антитела Эрбитукс с последующим вторичным мечением антибиотинами магнитными частицами. После одного цикла REM выделенные клетки анализировали путем проточной цитометрии на наличие поверхностной экспрессии CAR и Т-клеточного фенотипа. Экспрессия как Fc, так и EGFRt была больше 90% в созданных Т-клеточных линиях от трех здоровых доноров, и конечные Т-клеточные продукты состояли из смеси CD4- и CD8-положительных Т-клеток (фиг. 1B, 1C).

CD123-CAR-T-клетки специфически нацелены на CD123-экспрессирующие опухолевые клеточные линии

[0091] Для подтверждения специфичности CD123-CAR-T-клеток проверяли способность генетически модифицированных Т-клеток лизировать клетки 293T, временно трансфицированные для экспрессии CD123 (293T-CD123; фиг. 2A). Обе полученные CD123-CAR-T-клеточные линии эффективно лизировали 293T-CD123, но не клетки 293T, временно трансфицированные для экспрессии CD19, демонстрируя специфическое распознавание CD123 (фиг. 2B). Далее, цитолитическую емкость CD123-специфичных Т-клеток *in vitro* исследовали в отношении опухолевых клеточных линий, эндогенно экспрессирующих CD123. Экспрессию CD123 на клеточных линиях LCL и KG1a подтверждали с помощью проточной цитометрии (фиг. 2C). Обе CD123-специфичные Т-клеточные линии эффективно лизировали целевые линии LCL и KG1a, но не клеточную линию CD123-K562 (фиг. 2C). Парные CD19-специфичные Т-клетки

эффективно лизировали мишени CD19<sup>+</sup>LCL, но не мишени CD19<sup>-</sup>KG1a или K562 (фиг. 2D). Ложно-трансдуцированные исходные клетки лизировали только положительный контроль, клеточную линию LCL-ОКТ3 (фиг. 2D).

CD123-CAR-T-клетки активируют множественные эффекторные функции при совместном культивировании с CD123-положительными клетками-мишенями

[0092] Чтобы исследовать эффекторную функцию CD123-специфичных Т-клеток, измеряли секрецию IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  с последующим совместным культивированием с различными опухолевыми клеточными линиями. Т-клеточные продукты, экспрессирующие CD123-CAR, продуцировали как IFN- $\gamma$ , так и TNF- $\alpha$  при совместном культивировании с CD123<sup>+</sup>-клетками-мишенями, в то время как парные CD19-специфические Т-клетки секретируют эти цитокины только при совместном культивировании с клеточными линиями CD19<sup>+</sup>LCL или LCL-ОКТ3 (фиг. 3A). Кроме того, обе CD123-специфичные Т-клеточные линии пролиферировали при совместном культивировании с любой из клеточных линий CD123<sup>+</sup>LCL, LCL-ОКТ3 или KG1a, но не с клеточной линией CD123-K562 (фиг. 3B). Напротив, парные CD19-CAR-экспрессирующие Т-клетки пролиферировали только при совместном культивировании с LCL или LCL-ОКТ3 (фиг. 3B).

CD123-CAR-T-клетки активируют множественные эффекторные функции при совместном культивировании с первичными образцами AML

[0093] Сверхэкспрессия CD123 на первичных образцах AML хорошо задокументирована [27-29] и подтверждена в данном исследовании (фиг. 14). Многогранные Т-клеточные ответы имеют решающее значение для надежного иммунного ответа на инфекции и вакцины, а также могут играть роль в противоопухолевой активности CAR-перенацеленных Т-клеток [30]. Для исследования способности CD123-CAR-T-клеток активировать множественные эффекторные пути против первичных образцов AML инженерные Т-клетки культивировали совместно с тремя различными образцами от пациентов с AML (179, 373 и 605) в течение 6 часов и оценивали повышающую регуляцию CD107a и продукцию IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  с помощью полихроматической проточной цитометрии (стратегия гейтирования показана на фиг. 15). Мобилизация CD107a клеточной поверхности наблюдалась как в CD4-, так и в CD8-компартаментах CD123-специфичных Т-клеток, в то время как парные CD19-Т-клетки не показывали заметной дегрануляции против первичных образцов AML (фиг. 4A, столбчатые диаграммы). Кроме того, субпопуляции CD107a<sup>+</sup>CD123-CAR-T-клеток также продуцировали либо IFN- $\gamma$ , либо TNF- $\alpha$ , либо оба цитокина (фиг. 4A, круговые диаграммы). Эта многофункциональная реакция наблюдалась как для популяции CD4, так и для популяции CD8 (фиг. 4A и 4B). Кроме того, исследовали способность CAR-инженерных Т-клеток пролиферировать в ответ на совместное культивирование с первичными образцами AML. Обе CD123-специфичные Т-клеточные линии были способны к пролиферации после совместного культивирования с образцами AML 813 или пре-B-ALL-802 (фиг. 4C). Пролиферация наблюдалась в обеих популяциях CD4 и CD8 (фиг. 16). Парные CD19-специфические Т-клетки пролиферировали при совместном культивировании с CD19<sup>+</sup> пре-B-ALL-802, но не при совместном культивировании с AML 813.

CD123-CAR-экспрессирующие Т-клетки нацелены на первичные клетки AML in vitro

CD123-специфичные Т-клетки не устраняют формирование колоний клетками пуповинной крови in vitro

[0094] Учитывая, что CD123 экспрессируется на общих миелоидных предшественниках (common myeloid progenitor, CMP) [31], было исследовано влияние инженерных Т-клеток на способность образцов нормальной пуповинной крови (СВ), обогащенных CD34, формировать колонии. Формирование миелоидных и эритроидных колоний образцами СВ существенно не снижалось после 4-часового совместного культивирования с CD123-CAR-экспрессирующими Т-клетками в соотношении Е:Т=25:1 по сравнению с парными CD19R-CAR-Т-клетками (фиг. 6А и 6В). Далее исследовали способность CD123-специфичных Т-клеток ингибировать рост первичных клоногенных клеток AML in vitro. Обе CD123-CAR-Т-клеточные линии значительно уменьшали формирование лейкемических колоний по сравнению с парными CD19R-Т-клетками (фиг. 6С). Примечательно, что CD123-специфичные Т-клетки имели большее влияние на формирование лейкемических колоний по сравнению с формированием нормальных миелоидных колоний (фиг. 6D, снижение на 69% по сравнению со снижением на 31%, соответственно).

Т-клетки от пациентов с AML могут быть генетически модифицированы для экспрессии CD123 CAR и специфически нацелены на аутологичные опухолевые клетки.

[0095] Полученные от пациентов с AML Т-клетки, как известно, плохо реполяризуют актин и образуют дефектные иммунные синапсы с аутологичными бластами [32]. Кроме того, насколько мы знаем, CAR-экспрессирующие Т-клетки, полученные от пациентов с AML, до сих пор не описаны. Поэтому определяли, могут ли Т-клетки от пациентов с AML быть генетически модифицированы для экспрессии CD123 CAR.

Криоконсервированные PBMC (AML 605 и AML 722) или продукт афереза (AML 559) стимулировали CD3/CD28-частицами и трансдуцировали лентивирусами для экспрессии либо из CD123 CAR, либо CD19R контрольного CAR. Т-клетки, полученные из образцов всех трех пациентов, экспрессировали 26292 CAR (эффективность трансдукции 40-65%), 32716 CAR (эффективность трансдукции 46-70%) и CD19R CAR (для оценки способности CD123-специфичных Т-клеток уничтожать первичные клетки AML Т-клетки, экспрессирующие парные CD19R CAR или CD123 CAR, совместно культивировали с CD34-обогащенным первичным образцом от пациента с AML в 4-часовом анализе

высвобождения <sup>51</sup>Cr. В отличие от парных CD19R-Т-клеток, обе CD123-CAR-Т-клеточные линии сильно лизировали все анализируемые первичные образцы от пациентов с AML (фиг. 5А). Кроме того, в то время как между цитолитической способностью CD123-CAR-экспрессирующих Т-клеток не было отмечено никаких статистических различий, обе CD123-специфичные Т-клетки продемонстрировали значительное усиление цитотоксичности по сравнению с парными CD19R-CAR-Т-клетками (5В).

[0096] (Эффективность трансдукции 23-37%). Характерный пример фенотипа CAR-Т-клеток, полученных от пациентов с AML, показан на фиг. 7А. Далее проверяли цитолитический потенциал CAR-Т-клеток, полученных от пациентов с AML, против аутологичных CD34-обогащенных клеток-мишеней, в 4-часовом анализе высвобождения

<sup>51</sup>Cr. Все аутологичные CD34-обогащенные клетки экспрессировали CD123, хотя с различным процентом и интенсивностью (фиг. 7В). Т-клетки, полученные от AML 605 и 722, эффективно лизировали аутологичные бласты, в то время как Т-клетки, полученные от AML 559, демонстрировали низкие уровни лизиса аутологичных бластов, вероятно, из-за низкой и гетерогенной экспрессии CD123 на бластах AML 559 (фиг. 7С).

#### Обсуждение

[0097] Воплощения, описанные в данном документе, включают создание двух новых CD123-нацеленных CAR с использованием scFv из рекомбинантных иммунотоксинов (recombinant immunotoxin, RIT), 26292 и 32716, которые связывают различные эпитопы

и имеют аналогичные аффинности связывания с CD123 [18]. При экспрессии популяцией Т-клеток эти CD123-нацеленные CAR перенацеливают Т-клеточную специфичность в отношении клеток, экспрессирующих CD123. Используя стандартный 4-часовой анализ высвобождения хрома-51 ( $^{51}\text{Cr}$ ), Т-клетки здорового донора, которые были

спроектированы для экспрессии CD123 CAR, эффективно лизировали CD123<sup>+</sup>-клеточные линии и первичные образцы от пациентов с AML. Кроме того, обе CD123-CAR-Т-клеточные линии активировали множественные эффекторные функции после совместного культивирования с клеточными линиями CD123<sup>+</sup> и первичными образцами от пациентов с AML. Кроме того, CD123-нацеленные Т-клетки существенно не уменьшали число гранулоцитарно-макрофагальных колониеобразующих единиц (CFU-GM) и эритроидных единиц, образующих "взрывообразные" колонии (BFU-E) из пуповинной крови (СВ) по сравнению с CD19-CAR-Т-клетками. Примечательно, что в то время как CD19-специфические Т-клетки оказали небольшое влияние на формирование лейкемических колоний первичных образцов AML, CD123-нацеленные Т-клетки значительно снижали формирование лейкемических колоний *in vitro*. Было также показано, что Т-клетки, полученные от пациентов с AML, могут экспрессировать CD123 CAR и лизировать аутологичные бласты *in vitro*.

[0098] Т-клетки, экспрессирующие любой из двух CD123-специфичных CAR, могут специфически лизировать CD123-экспрессирующие клеточные линии и первичные образцы от пациентов с AML и активировать множественные эффекторные функции антигенспецифическим образом *in vitro*, показывая, что оба эпитопа являются потенциальными мишенями для лечения. Между CD123-CAR-инженерными Т-клеточными линиями не наблюдалось никаких серьезных различий в отношении уничтожения целевых клеток, секреции цитокинов или пролиферации при совместном культивировании с CD123<sup>+</sup>-клетками. Одно из возможных объяснений этого заключается в том, что связывающие аффинности CD123-специфичных scFv, используемых в CD123-CAR, находятся в наномолярном диапазоне и отличаются менее чем в 3 раза и, следовательно, scFv не дают никакого существенного преимущества в связывании целевого антигена [18].

[0099] Экспрессия множества антигенов клеточной поверхности на клетках AML была хорошо задокументирована [4, 27, 34]. Ориентация некоторых из этих антигенов на CAR-экспрессирующие Т-клетки может быть невозможной. Например, AML-ассоциированный антиген TIM-3 экспрессируется на подгруппе истощенных Т-клеток [35, 36] и нацеливание на TIM-3 с помощью CAR-инженерных Т-клеток может привести к аутолизу генетически модифицированных клеток. Кроме того, CD47 экспрессируется повсеместно [37] и, таким образом, вряд ли может быть мишенью CAR-инженерных Т-клеток. Антиген дифференциации CD33 преимущественно экспрессируется на миелоидных клетках, и иммунотерапевтические средства, нацеленные на CD33, такие как гемтузумаб озогамидин, антитела, связывающие CD33/CD3-биспецифические Т-клетки, и CD33 CAR в настоящее время используются в клинических и доклинических условиях [17, 38, 39]. Как и TIM-3, CD33 экспрессируется на подгруппе Т-клеток, что делает его неидеальной мишенью для терапии, основанной на CAR [40]. Кроме того, антилейкемическая активность CD33-нацеливающих терапевтических средств часто сопровождается медленным восстановлением кроветворения и цитопении, вероятно, в результате экспрессии CD33 на долгоживущих самообновляющихся нормальных гемопоэтических стволовых клетках (hematopoietic stem cell, HSC) [41]. Кроме того, гепатотоксичность является распространенным побочным эффектом CD33-нацеленного

лечения и, возможно, является результатом непреднамеренного нацеливания на CD33<sup>+</sup> клетки Купфера [42].

[00100] Экспрессия CD123 отсутствует на Т-клетках, преимущественно ограничена клетками миелоидного происхождения [43], и большей частью отсутствует на HSC [27].

5 Вместе, эти наблюдения делают CD123 привлекательной мишенью для CAR-опосредованной Т-клеточной терапии. Терапевтические средства, специфические для CD123, проявляют благоприятные профили безопасности в первой фазе испытаний (ClinicalTrials.gov ID: NCT00401739 и NCT00397579). К сожалению, эти терапевтические средства не смогли индуцировать реакцию у подавляющего большинства пациентов.

10 В CD123-CAR-экспрессирующие Т-клетки, полученные в данном исследовании, демонстрируют мощный цитолитический потенциал *in vitro* против CD123<sup>+</sup> клеточных линий и первичных образцов AML. Исследования, описанные ниже, показывают, что первичные образцы от пациентов с высоким риском AML, были чувствительны к цитотоксичности, опосредованной CD123-CAR-Т-клетками. В совокупности, в 15 небольшой когорте первичных образцов, используемой для краткосрочных анализов цитотоксичности, образцы от пациентов с AML, которые демонстрировали высокий риск постановки диагноза и/или химиорезистентность, были чувствительны к CD123-CAR-уничтожению аналогично тому, что наблюдалось в экспериментах с

20 использованием клеточных линий CD123<sup>+</sup>. Дальнейший анализ будет необходим для того, чтобы подтвердить, что эти результаты справедливы для увеличенной когорты образцов.

[00101] Многофункциональные Т-клеточные ответы коррелируют с контролем вирусной инфекции и могут быть важными в противоопухолевом CAR-Т-клеточном 25 ответе [44]. Действительно, пациенты, реагирующие на CD19-CAR-Т-клеточную терапию, имеют обнаруживаемые Т-клеточные ответы (т.е. дегрануляцию, секреция цитокинов или пролиферацию) после терапии в ответ на CD19<sup>+</sup> мишени *ex vivo* [11, 12, 14]. В приведенных ниже примерах была показана функциональность CD123-CAR-экспрессирующих Т-клеток путем анализа повышающей регуляции CD107a, продукции 30 цитокинов и пролиферации CD123-специфичных Т-клеток в ответ на обе CD123<sup>+</sup> клеточные линии и первичные AML-образцы. Кроме того, многофункциональность наблюдалось в обоих компартментах, как CD4<sup>+</sup>, так и CD8<sup>+</sup>, что может способствовать устойчивой противолейкемической активности и повышать противолейкемическую 35 активность в опухолевом микроокружении [45, 46]. Включение других костимуляторных доменов, таких как 4-1BB, и применение "более молодых" менее дифференцированных Т-клеток может усилить CD123-CAR-ответы и являются предметом активных исследований [9, 47].

[00102] Кроме того, CD123-специфичные Т-клетки не подавляют нормальное 40 образование колоний предшественников - даже при Е:Т=25:1. Экспрессия CD123 на клетках род<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> является отличительной чертой общей миелоидной клетки-предшественника и, таким образом, вероятно, является мишенью CD123-CAR-Т-клеток [31]. В то время как при инкубации СВ-клеток с CD123-специфичными Т-клетками наблюдалось уменьшение относительного процента колоний миелоидного 45 происхождения, снижение было не значительно меньше, чем у парных CD19R-CAR-Т-клеток. Возможно, что ограниченный размер образца объясняет этот результат, и дальнейшие эксперименты могут выявить значительное снижение в образовании CFU-GM в образцах пуповинной крови, обработанных CD123-CAR-Т-клетками. Кроме того,



4-часовое совместное культивирование Т-клеток и СВ-клеток перед посевом может быть недостаточно длительным периодом, чтобы наблюдать эффект формирования нормальной колонии миелоидного предшественника, и более долгие периоды инкубации могут снизить число наблюдаемых колоний миелоидного происхождения. Тем не менее, в той же методике, что использовалась для СВ-клеток, наблюдалось существенное уменьшение числа образованных лейкемических колоний, когда CD34-обогащенные первичные образцы от пациентов с AML инкубировали с CD123-CAR-T-клетками, подтверждая, что 4-часовая инкубация является достаточной, чтобы наблюдать эффект между формированием лейкемических и нормальных колоний. Альтернативно, более низкая относительная экспрессия CD123 на СВ-клетках по сравнению с AML-клетками частично может быть результатом неспособности CD123-CAR-T-клеток изменять формирование колоний миелоидного происхождения *in vitro*. Хотя другие показали, что CD123 экспрессируется только в небольшой части род<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> HSC, а два клинических испытания в I фазе с использованием агентов, нацеленных на CD123, не выявили долгосрочной миелосупрессии, необходимы дальнейшие исследования, чтобы оценить влияние CD123-CAR-T-клеточной терапии на кроветворение. Для того чтобы контролировать нежелательные токсичности "мимо мишени", в лентивирусную конструкцию был включен EGFRt для обеспечения абляции CAR-экспрессирующих Т-клеток. Другие стратегии для модуляции CAR-T-клеточной активности, такие как индуцируемое каспазой 9 переключение на апоптоз [48] или электропорация мРНК CAR [49], также вызывают большой интерес, учитывая потенциал для уничтожения нормальных клеток, экспрессирующих CD123.

[00103] Кроме того, было показано, что криоконсервированные PBMC от пациентов с активным AML, могут быть генетически модифицированы для экспрессии CD123-CAR и обладают сильной цитолитической активностью против аутологичных лейкемических бластов в 2/3 образцов. В то время как CD123-CAR-экспрессирующие Т-клетки от AML 559 не способны лизировать аутологичные бласты, которые экспрессируют низкие уровни CD123, эти CAR-T-клетки лизировали клеточные линии CD123<sup>+</sup>LCL и KG1a (данные не показаны), подтверждая, что созданные Т-клетки имеют потенциал нацеливания на CD123-экспрессирующих клетки-мишени. По нашим сведениям это первая демонстрация того, что Т-клетки, полученные от пациента с AML, могут быть спроектированы для экспрессии CAR и демонстрируют перенацеленную антигенспецифическую цитотоксичность против аутологичных бластов.

[00104] В совокупности результаты этих исследований, описанных в приведенных ниже примерах, показывают, что CD123-CAR-T-клетки могут различать клетки CD123<sup>+</sup> и CD123<sup>-</sup> и могут активировать множественные Т-клеточные эффекторные функции против панели образцов от пациентов с высоким риском первичного AML. Следует отметить, что CD123-специфичные Т-клетки существенно не изменяли нормальное формирование колоний предшественников, но значительно снижали рост клоногенных миелоидных лейкемических предшественников *in vitro*. Также было показано, что Т-клетки, полученные от пациентов с AML, могут быть генетически модифицированы для экспрессии CD123-специфичных CAR и могут лизировать аутологичные бласты *in vitro*. Таким образом, CD123-CAR-T-клетки являются перспективным кандидатом для иммунотерапии AML.

Пример 2: задержка лейкемической прогрессии CD123-CAR-трансдуцированными Т-клетками *in vivo*

[00105] Конструкции CD123-CAR. Конструкции 26292CAR (S228P+L235E) и 32716CAR

(S228P+L235E) были созданы, как описано в примере 1 выше. Также были созданы две дополнительные CD123-CAR-конструкции, которые включали дополнительную мутацию в шарнирной области IgG4 в позиции 297 (N297Q) для каждого scFv ("26292CAR(S228P+L235E+N297Q)" и "32716CAR(S228P+L235E+N297Q)") (фиг. 12 и 13, мутации выделены жирным шрифтом и подчеркнуты).

[00106] Мышам NSG имплантировали опухолевые клетки AML (день 0), на 5-й день вводили  $5,0 \times 10^6$  CAR<sup>+</sup>-Т-клеток, экспрессирующих либо 26292CAR(S228P+L235E), либо 26292CAR(S228P+L235E+N297Q), и контролировали лейкемическую прогрессию путем биоллюминесцентной визуализации. Как показано на фиг. 8, у мышей, получавших Т-клетки, трансдуцированные 26292CAR(S228P+L235E), лейкемическая нагрузка прогрессировала на 8-й день по сравнению с днем введения, подтверждая, что клетки, трансдуцированные конструкцией CD123CAR, содержащей мутации шарнирной области в позициях S228P и L235E, не имели никакого эффекта *in vivo*. Напротив, мыши, получавшие Т-клетки, трансдуцированные 26292CAR(S228P+L235E+N297Q), продемонстрировали уменьшение размера опухолей по сравнению с днем введения, подтверждая, что добавление мутации в шарнирную область в позиции 297 (N297Q) дает конструкцию CD123CAR, которая может задерживать лейкемическую прогрессию *in vivo*.

#### Ссылки

Ссылки, патенты и опубликованные патентные заявки, перечисленные ниже, и все ссылки, приведенные в указанном выше описании, включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме, как если бы они полностью были изложены в данном документе.

1. Eaves, C.J. and R.K. Humphries, Acute myeloid leukemia and the Wnt pathway. *N Engl J Med*, 2010. 362(24): p. 2326-7.

2. Dohner, H., et al., Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, 2010. 115(3): p. 453-74.

3. Majeti, R., Monoclonal antibody therapy directed against human acute myeloid leukemia stem cells. *Oncogene*, 2011. 30(9): p. 1009-19.

4. Kikushige, Y., et al., TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells. *Cell Stem Cell*, 2010. 7(6): p. 708-17.

5. Jena, B., G. Dotti, and L.J. Cooper, Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor. *Blood*, 2010. 116(7): p. 1035-44.

6. Cooper, L.J., et al., T-cell clones can be rendered specific for CD19: toward the selective augmentation of the graft-versus-B-lineage leukemia effect. *Blood*, 2003. 101(4): p. 1637-44.

7. Hudecek, M., et al., The B-cell tumor-associated antigen ROR1 can be targeted with T cells modified to express a ROR1-specific chimeric antigen receptor. *Blood*, 2010. 116(22): p. 4532-41.

8. Kochenderfer, J.N., et al., Construction and preclinical evaluation of an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J Immunother*, 2009. 32(7): p. 689-702.

9. Milone, M.C., et al., Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy *in vivo*. *Mol Ther*, 2009. 17(8): p. 1453-64.

10. Brentjens, R.J., et al., Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nat Med*, 2003. 9(3): p. 279-86.

11. Brentjens, R.J., et al., Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood*,

2011. 118(18): p. 4817-28.

12. Kochenderfer, J.N., et al., B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric antigen-receptor-transduced T cells. *Blood*, 2011.

13. Savoldo, B., et al., CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *J Clin Invest*, 2011. 121(5): p. 1822-6.

14. Kalos, M., et al., T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced Leukemia. *Sci Transl Med*, 2011. 3(95): p. 95ra73.

15. Till, B.G., et al., CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results. *Blood*, 2012.

16. Peinert, S., et al., Gene-modified T cells as immunotherapy for multiple myeloma and acute myeloid leukemia expressing the Lewis Y antigen. *Gene Ther*, 2010. 17(5): p. 678-86.

17. Dutour, A., et al., In Vitro and In Vivo Antitumor Effect of Anti-CD33 Chimeric Receptor-Expressing EBV-CTL against CD33 Acute Myeloid Leukemia. *Adv Hematol*, 2012. 2012: p. 683065.

18. Du, X., M. Ho, and I. Pastan, New immunotoxins targeting CD123, a stem cell antigen on acute myeloid leukemia cells. *J Immunother*, 2007. 30(6): p. 607-13.

19. Pelloquin, F., J.P. Lamelin, and G.M. Lenoir, Human B lymphocytes immortalization by Epstein-Barr virus in the presence of cyclosporin A. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1986. 22(12): p. 689-94.

20. Wang, X., et al., A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells. *Blood*, 2011. 118(5): p. 1255-63.

21. Reddy, M.P., et al., Elimination of Fc receptor-dependent effector functions of a modified IgG4 monoclonal antibody to human CD4. *J Immunol*, 2000. 164(4): p. 1925-33.

22. Nguyen, P., I. Moisini, and T.L. Geiger, Identification of a murine CD28 dileucine motif that suppresses single-chain chimeric T-cell receptor expression and function. *Blood*, 2003. 102(13): p. 4320-5.

23. Jensen, M.C., et al., Human T lymphocyte genetic modification with naked DNA. *Mol Ther*, 2000. 1(1): p. 49-55.

24. Riddell, S.R. and P.D. Greenberg, The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells. *J Immunol Methods*, 1990. 128(2): p. 189-201.

25. Brown, C.E., et al., Recognition and killing of brain tumor stem-like initiating cells by CD8+ cytolytic T cells. *Cancer Res*, 2009. 69(23): p. 8886-93.

26. Bhatia, R., et al., Abnormal function of the bone marrow microenvironment in chronic myelogenous leukemia: role of malignant stromal macrophages. *Blood*, 1995. 85(12): p. 3636-45.

27. Jordan, C.T., et al., The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia*, 2000. 14(10): p. 1777-84.

28. Jin, L., et al., Monoclonal antibody-mediated targeting of CD123, IL-3 receptor alpha chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2009. 5(1): p. 31-42.

29. Munoz, L., et al., Interleukin-3 receptor alpha chain (CD123) is widely expressed in hematologic malignancies. *Haematologica*, 2001. 86(12): p. 1261-9.

30. Seder, R.A., P.A. Darrah, and M. Roederer, T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol*, 2008. 8(4): p. 247-58.

31. Manz, M.G., et al., Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002. 99(18): p. 11872-7.

32. Le Dieu, R., et al., Peripheral blood T cells in acute myeloid leukemia (AML) patients at

diagnosis have abnormal phenotype and genotype and form defective immune synapses with AML blasts. *Blood*, 2009. 114(18): p. 3909-16.

33. Oka, Y., et al., Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004. 101(38): p. 13885-90.

34. Majeti, R., et al., CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell*, 2009. 138(2): p. 286-99.

35. Golden-Mason, L., et al., Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4+ and CD8+ T cells. *J Virol*, 2009. 83(18): p. 9122-30.

36. Jin, H.T., et al., Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010. 107(33): p. 14733-8.

37. Brown, E.J. and W.A. Frazier, Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol*, 2001. 11(3): p. 130-5.

38. Walter, R.B., et al., Acute myeloid leukemia stem cells and CD33-targeted immunotherapy. *Blood*, 2012. 119(26): p. 6198-208.

39. Aigner, M., et al., T lymphocytes can be effectively recruited for ex vivo and in vivo lysis of AML blasts by a novel CD33/CD3-bispecific BiTE((R)) antibody construct. *Leukemia*, 2012.

40. Hernandez-Caselles, T., et al., A study of CD33 (SIGLEC-3) antigen expression and function on activated human T and NK cells: two isoforms of CD33 are generated by alternative splicing. *J Leukoc Biol*, 2006. 79(1): p. 46-58.

41. Sievers, E.L., et al., Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Oncol*, 2001. 19(13): p. 3244-54.

42. Tsimberidou, A.M., et al., The role of gemtuzumab ozogamicin in acute leukaemia therapy. *Br J Haematol*, 2006. 132(4): p. 398-409.

43. Sato, N., et al., Expression and factor-dependent modulation of the interleukin-3 receptor subunits on human hematopoietic cells. *Blood*, 1993. 82(3): p. 752-61.

44. Appay, V., D.C. Douek, and D.A. Price, CD8+ T cell efficacy in vaccination and disease. *Nat Med*, 2008. 14(6): p. 623-8.

45. Moeller, M., et al., Sustained antigen-specific antitumor recall response mediated by gene-modified CD4+ T helper-1 and CD8+ T cells. *Cancer Res*, 2007. 67(23): p. 11428-37.

46. Schietinger, A., et al., Bystander killing of cancer requires the cooperation of CD4(+) and CD8(+) T cells during the effector phase. *J Exp Med*, 2010. 207(11): p. 2469-77.

47. Gattinoni, L., et al., A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med*, 2011. 17(10): p. 1290-7.

48. Straathof, K.C., et al., An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood*, 2005. 105(11): p. 4247-54.

49. Yoon, S.H., et al., Adoptive immunotherapy using human peripheral blood lymphocytes transferred with RNA encoding Her-2/neu-specific chimeric immune receptor in ovarian cancer xenograft model. *Cancer Gene Ther*, 2009. 16(6): p. 489-97.

50. Strohl, W.R., Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies. *Curr Op Biotech*. 2009. 20: 685-691.

#### (57) Формула изобретения

1. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая химерный антигенный рецептор, нацеленный на CD123 и включающий: анти-CD123-scFv-область; шарнирную область IgG4, содержащую последовательность SEQ ID NO: 13, имеющую замену аминокислоты N на Q в положении 79 и замену аминокислоты L на E в положении 17 и необязательно

замену аминокислоты S на P в положении 10; трансмембранный домен; костимуляторный сигнальный домен, выбранный из группы, состоящей из костимуляторного сигнального домена CD27, костимуляторного сигнального домена CD28, костимуляторного сигнального домена 4-1BB и костимуляторного сигнального домена OX40; и сигнальный домен дзета-цепи Т-клеточного рецептора.

2. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 1, где шарнирная область IgG4, содержащая SEQ ID NO: 13, имеет замену аминокислоты S на P в положении 10.

3. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 1, где указанный костимуляторный сигнальный домен представляет собой костимуляторный сигнальный домен CD28 или костимуляторный сигнальный домен 4-1BB.

4. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 1, где анти-CD123-scFv домен содержит: домен V<sub>L</sub> и V<sub>H</sub> рекомбинантного иммунотоксина 26292 или домен V<sub>L</sub> и V<sub>H</sub> рекомбинантного иммунотоксина 32716.

5. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 1, где химерный антигенный рецептор содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12.

6. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 1, содержащая нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4.

7. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 1, где химерный антигенный рецептор содержит трансмембранный домен CD28.

8. Экспрессионный вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 1.

9. Экспрессионный вектор по п. 8, где вектор является вирусным вектором.

10. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 1, где анти-CD123-scFv-область является гуманизированной анти-CD123-scFv-областью.

11. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 1, где анти-CD123-scFv-область содержит аминокислоты 23-266 SEQ ID NO: 9.

12. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 1, где анти-CD123-scFv-область содержит аминокислоты 23-259 SEQ ID NO: 10.

13. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 1, где шарнирная область IgG4 содержит аминокислоты 267-495 SEQ ID NO: 9.

14. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 1, где химерный антигенный рецептор содержит костимуляторный сигнальный домен CD28.

15. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 14, где костимуляторный сигнальный домен CD28 содержит аминокислоты 498-564 SEQ ID NO: 9.

16. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 14, где костимуляторный сигнальный домен CD28 содержит аминокислоты 489-557 SEQ ID NO: 10.

17. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 1, где химерный антигенный рецептор содержит костимуляторный сигнальный домен 4-1BB.

18. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 14, где сигнальный домен дзета-цепи Т-клеточного рецептора содержит аминокислоты 568-679 SEQ ID NO: 9.

19. Экспрессионная кассета, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 1 и необязательно нуклеотидную последовательность, кодирующую вспомогательный ген, выбранный из усеченного рецептора эпидермального фактора роста EGFR (EGFRt).

20. Экспрессионная кассета по п. 19, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую вспомогательный ген, выбранный из усеченного рецептора эпидермального фактора роста EGFR (EGFRt).

21. Популяция человеческих Т-клеток для лечения острого миелоидного лейкоза

(AML) у субъекта, где указанные Т-клетки трансдуцированы вирусным вектором, содержащим экспрессионную кассету по п. 19, где указанный вирусный вектор предназначен для экспрессии химерного антигенного рецептора, нацеленного на CD123, на поверхности указанных клеток.

- 5 22. Способ лечения острого миелоидного лейкоза (AML) у субъекта, включающий введение субъекту популяции Т-клеток по п. 21, где Т-клетки являются аутологичными.

10

15

20

25

30

35

40

45

## SEQUENCE LISTING

<110> CITY OF HOPE  
 FORMAN, Stephen  
 MARDIRO, Armen  
 <120> CD123-SPECIFIC CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR REDIRECTED T CELLS AND  
 METHODS OF THEIR USE  
 <130> 54435.8127.W000  
 <150> US 13/844,048  
 <151> 2013-03-15  
 <160> 13  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 2052  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> antisense nucleotide sequence of the 32716CAR(S228P+L235E)  
 construct  
 <400> 1  
 gctagcgccg ccaccatgct gctgctggtg accagcctgc tgctgtgcga gctgccccac 60  
 cccgcctttc tgctgatccc ccagattcag ctggtgcaga gcggcccga actgaaaaaa 120  
 ccgggcgaaa ccgtgaaaat tagctgcaaa gcgagcggct atatttttac caactatggc 180  
 atgaactggg tgaacagggc gccgggcaaa agctttaaat ggatgggctg gattaacacc 240  
 tataccggcg aaagcaccta tagcgcggat tttaaaggcc gctttgcgtt tagcctggaa 300  
 accagcgcga gcaccgcgta tctgcatatt aacgatctga aaaacgaaga taccgcgacc 360  
 tatttttgcg cgcgcgagcg cggctatgat ccgatggatt attggggcca gggcaccagc 420  
 gtgaccgtga gcagcggcg cggcggcagc ggcggcggcg gcagcggcg cggcggcagc 480  
 gatattgtgc tgaccagag cccggcgagc ctggcggtga gcctgggcca gcgcgcgacc 540  
 attagctgcc gcgcgagcga aagcgtggat aactatggca acacctttat gcattggtat 600  
 cagcagaaac cgggccagcc gccgaaactg ctgatttata gcgcgagcaa cctggaaagc 660  
 ggcattccgg cgcgctttag cggcagcggc agccgcaccg attttaccct gaccattaac 720  
 ccggtggaag cggatgatgt ggcgacctat tattgccagc agagcaacga agatccgccg 780  
 acctttggcg cgggcaccaa actggaactg aaagagagca agtacggccc tcctgcccc 840  
 ccttgcctg ccccgagtt cgagggcgga cccagcgtgt tcctgttccc cccaagccc 900  
 aaggacacc tgatgatcag ccggaccccc gaggtgacct gcgtggtggt ggacgtgagc 960  
 caggaagatc ccgaggtcca gttcaattgg tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc 1020  
 aagaccaagc ccagagagga acagttcaac agcacctacc gggtggtgtc tgtgctgacc 1080

Page 1

gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa gaatacaagt gcaaggtgtc caacaagggc 1140  
ctgcccagca gcatcgaaaa gaccatcagc aaggccaagg gccagcctcg cgagccccag 1200  
gtgtacacc tgcctccctc ccaggaagag atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgc 1260  
ctggtgaagg gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa cggccagcct 1320  
gagaacaact acaagaccac ccctcccgtg ctggacagcg acggcagctt cttcctgtac 1380  
agccggctga ccgtggacaa gagccggtgg caggaaggca acgtctttag ctgcagcgtg 1440  
atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc cagaagagcc tgagcctgtc cctgggcaag 1500  
atgttctggtg tgctgggtgtg ggtgggcggg gtgctggcct gctacagcct gctggtgaca 1560  
gtggccttca tcatcttttg ggtgcggagc aagcggagca gaggcggcca cagcgactac 1620  
atgaacatga cccccagacg gcctggcccc acccggaaagc actaccagcc ctacgcccc 1680  
cccagggact ttgccgccta ccggtccggc ggaggggcggg tgaagttagc cagaagcgcc 1740  
gacgccccctg cctaccagca gggccagaat cagctgtaca acgagctgaa cctgggcaga 1800  
aggggaagagt acgacgtcct ggataagcgg agaggccggg accctgagat gggcggaag 1860  
cctcggcgga agaaccacca ggaaggcctg tataacgaac tgcagaaaga caagatggcc 1920  
gaggcctaca gcgagatcgg catgaagggc gagcggaggc ggggcaaggc ccacgacggc 1980  
ctgtatcagg gcctgtccac cgccaccaag gatacctacg acgccctgca catgcaggcc 2040  
ctgcccccaa gg 2052

<210> 2  
<211> 2031  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense nucleotide sequence of the 26292CAR(S228P+L235E) construct

<400> 2  
gctagcgccg ccaccatgct gctgctggtg accagcctgc tgctgtgcga gctgccccac 60  
cccgcctttc tgctgatccc ccaggtgcag ctgcagcagc cgggcgcgga actggtgcgc 120  
ccgggcgcga gcgtgaaact gagctgcaaa gcgagcggct atacctttac cagctattgg 180  
atgaactggg tgaaacagcg cccggatcag ggcctggaat ggattggccg cattgatccg 240  
tatgatagcg aaaccatta taaccagaaa tttaaagata aagcgattct gaccgtggat 300  
aaaagcagca gcaccgcgtg tatgcagctg agcagcctga ccagcgaaga tagcgcggtg 360  
tattattgcg cgcgcgga ctgggatgat tattggggcc agggcaccac cctgaccgtg 420  
agcagcggcg gcggcgagc cggcgggcggc ggcagcggcg gcggcgagc cgatgtgcag 480  
attaccagca gcccagccta tctggcgcg agcccgggcg aaaccattac cattaactgc 540  
cgcgcgagca aaagcattag caaagatctg gcgtggtatc agggaaaaacc gggcaaaacc 600

Page 2



```

aacaactgc tgatttatag cggcagcacc ctgcagagcg gcattccgag ccgcttttagc 660
ggcagcggca gcggcaccga ttttaccctg accattagca gcctggaacc ggaagatttt 720
gcgatgtatt attgccagca gcataacaaa tatccgtata cctttggcgg cggcaccaaaa 780
ctggaaatta aagagagcaa gtacggccct ccctgcccc cttgacctgc ccccgagttc 840
gagggcggac ccagcgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacaccct gatgatcagc 900
cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc aggaagatcc cgaggtccag 960
ttcaattggt acgtggacgg cgtggaagtg cacaacgcca agaccaagcc cagagaggaa 1020
cagttcaaca gcacctaccg ggtggtgtct gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg 1080
aacggcaaag aatacaagtg caaggtgtcc aacaagggcc tgcccagcag catcgaaaaag 1140
accatcagca aggccaaggg ccagcctcgc gagccccagg tgtacaccct gcctccctcc 1200
caggaagaga tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgcc tgggtgaaggg cttctacccc 1260
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagcctg agaacaacta caagaccacc 1320
cctcccgatc tgacagcga cggcagcttc ttctgtaca gccggctgac cgtggacaag 1380
agccggtgag aggaaggcaa cgtcttttagc tgcagcgtga tgcacgaggc cctgcacaac 1440
cactacaccc agaagagcct gagcctgtcc ctgggcaaga tgttctgggt gctggtggtg 1500
gtgggcgggg tgctggcctg ctacagcctg ctggtgacag tggccttcat catcttttgg 1560
gtgcggagca agcggagcag aggcggccac agcgactaca tgaacatgac ccccagacgg 1620
cctggcccca cccggaagca ctaccagccc tacgccccac ccagggaactt tgccgcctac 1680
cgggtccggc gagggcgggg gaagttcagc agaagcgccg acgcccctgc ctaccagcag 1740
ggccagaatc agctgtacaa cgagctgaac ctgggcagaa gggaagagta cgacgtcctg 1800
gataagcgga gaggccggga ccctgagatg ggcggcaagc ctcggcgga gaacccccag 1860
gaaggcctgt ataacgaact gcagaaagac aagatggccg aggcctacag cgagatcggc 1920
atgaaggcg agcggaggcg gggcaaggcc cagcagggcc tgtatcaggg cctgtccacc 1980
gccaccaagg atacctacga cgccctgcac atgcaggccc tgccccaag g 2031

```

```

<210> 3
<211> 2052
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> antisense nucleotide sequence of the 32716CAR(S228P+L235E+N297Q)
construct

```

```

<400> 3
gctagcgccg ccaccatgct gctgctggtg accagcctgc tgctgtgcga gctgccccac 60
cccgcccttc tgctgatccc ccagattcag ctggtgcaga gcggcccgga actgaaaaaa 120

```

ccgggcgaaa ccgtgaaaat tagctgcaaa gcgagcggct atatttttac caactatggc	180
atgaactggg tgaacacggc gccgggcaaa agctttaaat ggatgggctg gattaacacc	240
tataccggcg aaagcaccta tagcgcggat tttaaaggcc gctttgcgtt tagcctggaa	300
accagcgcga gcaccgcgta tctgcatatt aacgatctga aaaacgaaga taccgcgacc	360
tatTTTTGCG cgcgcagcgg cggctatgat ccgatggatt attggggcca gggcaccagc	420
gtgaccgtga gcagcggcgg cggcggcagc ggcggcggcg gcagcggcgg cggcggcagc	480
gatattgtgc tgacccagag cccggcgcgc ctggcgggtga gcctgggcca gcgcgcgacc	540
attagctgcc gcgcgagcga aagcgtggat aactatggca acacctttat gcatttgtat	600
cagcagaaac cgggccagcc gccgaaactg ctgatttatt gcgcgagcaa cctggaaagc	660
ggcattccgg cgcgctttag cggcagcggc agccgcaccg attttaccct gaccattaac	720
ccggtggaag cggatgatgt ggcgacctat tattgccagc agagcaacga agatccgccg	780
acctttggcg cgggcaccaa actggaactg aaagagagca agtacggccc tccctgcccc	840
ccttgccctg cccccaggtt cgagggcgga cccagcgtgt tcctgttccc cccaagccc	900
aaggacacc tgatgatcag ccggaccccc gaggtgacct gcgtggtggt ggacgtgagc	960
caggaagatc ccgaggtcca gttcaattgg tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc	1020
aagaccaagc ccagagagga acagtccar agcacctacc ggggtggtgtc tgtgtgacc	1080
gtgtgcacc aggactggct gaacggcaaa gaatacaagt gcaagggtgtc caacaagggc	1140
ctgcccagca gcatcgaaaa gaccatcagc aaggccaagg gccagcctcg cgagccccag	1200
gtgtacacc tgctccctc ccaggaagag atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgc	1260
ctggtgaagg gcttctacc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa cggccagcct	1320
gagaacaact acaagaccac ccctcccgct ctggacagc acggcagctt cttcctgtac	1380
agccggctga ccgtggacaa gagccggtgg caggaaggca acgtcttttag ctgcagcgtg	1440
atgcacgagg ccctgcacaa cactacacc cagaagagcc tgagcctgtc cctgggcaag	1500
atgttctggg tgctggtggt ggtgggcggg gtgctggcct gctacagcct gctggtgaca	1560
gtggccttca tcatctttt ggtgcggagc aagcggagca gaggcggcca cagcgactac	1620
atgaacatga cccccagac gcctggcccc acccggaaagc actaccagcc ctacgcccc	1680
cccagggaact ttgccgccta ccggtccggc ggagggcggg tgaagttag cagaagcgcc	1740
gacgcccctg cctaccagca gggccagaat cagctgtaca acgagctgaa cctgggcaga	1800
aggaagaggt acgacgtcct ggataagcgg agaggccggg accctgagat gggcggcaag	1860
cctcggcgga agaaccacca ggaaggcctg tataacgaac tgcagaaaga caagatggcc	1920
gaggcctaca gcgagatcgg catgaaggc gagcggaggc ggggcaagg ccacgacggc	1980
ctgtatcagg gcctgtccac cgccaccaag gatacctacg acgccctgca catgcaggcc	2040

ctgcccccaa gg

2052

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 2031

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense nucleotide sequence of the 26292CAR(S228P+L235E+N297Q) construct

&lt;400&gt; 4

gctagcgccg ccaccatgct gctgctggtg accagcctgc tgctgtgcga gctgccccac	60
cccgcccttc tgctgatccc ccaggtgcag ctgcagcagc cgggcgcgga actggtgcgc	120
ccgggcgcgga gcgtaaaact gagctgcaaa gcgagcggct atacctttac cagctattgg	180
atgaactggg tgaacacgag cccggatcag ggcctggaat ggattggccg cattgatccg	240
tatgatagcg aaaccatta taaccagaaa tttaaagata aagcgattct gaccgtggat	300
aaaagcagca gcaccgcgta tatgcagctg agcagcctga ccagcgaaga tagcgcggtg	360
tattattgcg cgcgcggcaa ctgggatgat tattggggcc agggcaccac cctgaccgtg	420
agcagcggcg gcggcgcgag cggcgcgcg gcgagcggcg gcggcgcgag cgatgtgcag	480
attaccaga gcccgagcta tctggcgcg agcccgggcg aaaccattac cattaactgc	540
cgcgcgagca aaagcattag caaagatctg gcgtggtatc aggaaaaacc gggcaaaacc	600
aacaaactgc tgatttatag cggcagcacc ctgcagagcg gcattccgag ccgcttttagc	660
ggcagcggca gcggcaccga ttttaccctg accattagca gcctggaacc ggaagatttt	720
gcgatgtatt attgccagca gcataacaaa tatccgtata cctttggcgg cggcaccaaa	780
ctggaaatta aagagagcaa gtacggccct ccctgcccc cttgccctgc ccccgagttc	840
gagggcgga cagcgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacaccct gatgatcagc	900
cggaccccc aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc aggaagatcc cgaggtccag	960
ttcaattggt acgtggacgg cgtggaagtg cacaacgcca agaccaagcc cagagaggaa	1020
cagtcaara gcacctaccg ggtggtgtct gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg	1080
aacggcaaag aatacaagtg caaggtgtcc aacaagggcc tgcccagcag catcgaaaag	1140
accatcagca aggccaaagg ccagcctcgc gagccccagg tgtacaccct gcctccctcc	1200
caggaagaga tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgcc tggatgaagg cttctacccc	1260
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagcctg agaacaacta caagaccacc	1320
cctcccgtgc tggacagcga cggcagcttc ttcctgtaca gccggctgac cgtggacaag	1380
agccggtggc aggaaggcaa cgtcttttagc tgcagcgtga tgcacgaggc cctgcacaac	1440
cactacaccc agaagagcct gagcctgtcc ctgggcaaga tgttctgggt gctggtggtg	1500
gtgggcgggg tgctggcctg ctacagcctg ctggtgacag tggccttcat catcttttgg	1560

Page 5

```

gtgcggagca agcggagcag aggcggccac agcgactaca tgaacatgac cccagacgg 1620
cctggcccca cccggaagca ctaccagccc tacgccccac ccagggactt tgccgcctac 1680
cgggtccggcg gagggcgggg gaagttcagc agaagcgccg acgccccctgc ctaccagcag 1740
ggccagaatc agctgtacaa cgagctgaac ctgggcagaa ggaagagta cgacgtcctg 1800
gataagcggg gagggcggga ccctgagatg ggcggcaagc ctcggcgga gaacccccag 1860
gaaggcctgt ataacgaact gcagaaagac aagatggcgg aggcctacag cgagatcggc 1920
atgaaggcg agcggaggcg gggcaaggcg cacgacggcc tgtatcaggg cctgtccacc 1980
gccaccaagg atacctacga cgccctgcac atgcaggccc tgccccaag g 2031

```

```

<210> 5
<211> 2052
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> sense nucleotide sequence of the 32716CAR(S228P+L235E) construct

```

```

<400> 5
cgatcgcggc ggtggtacga cgacgaccac tggtcggacg acgacacgct cgacggggtg 60
gggcggaag acgactaggg ggtctaagtc gaccacgtct cgccgggcct tgactttttt 120
ggcccgttt ggcactttta atcgacgttt cgctcgccga tataaaaatg gttgataccg 180
tacttgacc actttgtccg cgcccgttt tcgaaattta cctacccgac ctaattgtgg 240
atatggccgc tttcgtggat atcgcgcta aaatttcgg cgaaacgcaa atcggacctt 300
tggtcgcgct cgtggcgcat agacgtataa ttgctagact ttttgcttct atggcgctgg 360
ataaaaacgc gcgcgtcgcc gccgatacta ggctaccta taaccccggg cccgtggtcg 420
cactggcact cgtcgccgcc gccgccgtcg ccgccgccgc cgtcgccgcc gccgccgtcg 480
ctataacacg actgggtctc gggccgctcg gaccgccact cggaccggg cgcgcgctgg 540
taatcgacgg cgcgctcgct ttcgcaccta ttgataccgt tgtggaaata cgtaaccata 600
gtcgtctttg gcccggtcgg cggctttgac gactaaatag cgcgctcgtt ggacctttcg 660
ccgtaaggcc gcgcgaaatc gccgtcgccg tcggcggtgg taaaatggga ctggtaattg 720
ggccaccttc gcctactaca ccgctggata ataacggtcg tctcgttgct tctaggcggc 780
tggaaccgc gcccggtggt tgaccttgac tttctctcgt tcatgccggg agggacgggg 840
ggaacgggac gggggctcaa gctccgcct gggtcgcaca aggacaagg ggggttcggg 900
ttcctgtggg actactagtc ggcctggggg ctccactgga cgcaccacca cctgcaactc 960
gtccttctag ggctccagg caagttaacc atgcacctgc cgcaccttca cgtgttcg 1020
ttctgggttc ggtctctcct tgtcaagttg tcgtggatgg ccaccacag acacgactgg 1080
cacgacgtgg tcctgaccga cttgccgttt cttatgttca cgttcacag gttgttccc 1140

```

Page 6

gacgggtcgt cgtagctttt ctggtagtcg ttccggttcc cggtcggagc gtcggggtc 1200  
 cacatgtggg acggagggag ggtccttctc tactggttct tggccacag ggactggacg 1260  
 gaccacttcc cgaagatggg gtcgctgtag cggcacctca ccctctcgtt gccggtcggg 1320  
 ctcttgttga tgttctggtg gggagggcac gacctgtcgc tgccgtcgaa gaaggacatg 1380  
 tcggccgact ggcacctgtt ctcggccacc gtccttccgt tgcagaaatc gacgtcgcac 1440  
 tacgtgctcc gggacgtgtt ggtgatgtgg gtcttctcgg actcggacag ggacccgttc 1500  
 tacaagacct acgaccacca ccaccgccc caccgaccga cgatgtcggg cgaccactgt 1560  
 caccggaagt agtagaaaac ccacgcctcg ttccgcctcg ctccgccggt gtcgctgatg 1620  
 tacttgactt gggggctcgc cggaccgggg tgggccttcg tgatggtcgg gatcggggtt 1680  
 ggggtccctga aacggcggat ggcagggccg cctccgccc acttcaagtc gtcttcgcgg 1740  
 ctgcggggac ggatggtcgt cccggtctta gtcgacatgt tgctcgactt ggacccgtct 1800  
 tcccttctca tgctgcagga cctattcgcc tctccggccc tgggactcta cccgccgttc 1860  
 ggagccgctt tcttgggggt ccttcgggac atattgcttg acgtcttctt gttctaccgg 1920  
 ctccggatgt cgtctagcc gtacttcccg ctgcctccg ccccgttccc ggtgctgccg 1980  
 gacatagtcc cggacaggtg gcggtggtt ctatggatgc tgcgggacgt gtacgtccgg 2040  
 gacgggggtt cc 2052

<210> 6  
 <211> 2031  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> sense nucleotide sequence of the 26292CAR(S228P+L235E) construct

<400> 6  
 cgatcgcggc ggtggtacga cgacgaccac tggtcggacg acgacacgct cgacggggtg 60  
 gggcggaag acgactaggg ggtccacgtc gacgtcgtcg gcccgcgcct tgaccacgcg 120  
 ggcccgcgct cgcactttga ctgcagcttt cgtcgcgca tatggaaatg gtcgataacc 180  
 tacttgacct actttgtcgc gggcctagtc ccggacctta cctaaccggc gtaactaggc 240  
 atactatcgc tttgggtaat attggtcttt aaatttctat ttcgctaaga ctggcaccta 300  
 ttttcgtcgt cgtggcgcac atacgtcgac tcgtcggact ggtcgttct atcgcgccac 360  
 ataataacgc gcgcgccgtt gaccctacta ataaccccgg tcccgtggtg ggactggcac 420  
 tcgtcgccgc cgccgccgtc gccgccgccc cgtcgcgccc cgccgccgtc gctacacgtc 480  
 taatgggtct cgggctcgat agaccgccgc tcgggcccgc tttggtaatg gtaattgacg 540  
 gcgcgctcgt tttcgaatc gtttctagac cgcaccatag tcctttttgg cccgttttgg 600  
 ttgtttgacg actaaatc gccgtcgtgg gacgtctcgc cgtaaggctc ggcgaaatcg 660

Page 7

```

ccgtcgccgt cgccgtggct aaaatgggac tggtaatcgt cggaccttgg ccttctaaaa 720
cgctacataa taacggtcgt cgtattgttt ataggcatat ggaaccgcc gccgtggttt 780
gacctttaat ttctctcgtt catgccggga gggacggggg gaacgggacg ggggctcaag 840
ctccgcctg ggtcgcacaa ggacaagggg ggggttcgggt tcctgtggga ctactagtcg 900
gcctgggggc tccactggac gcaccaccac ctgcactcgg tccttctagg gctccaggtc 960
aagttaacca tgcacctgcc gcaccttcac gtgttgccgt tctggttcgg gtctctcctt 1020
gtcaagtgtt cgtggatggc ccaccacaga cactgactgg acgacgtggg cctgaccgac 1080
ttgccgtttt ttatgttcac gtccacagg ttgttcccgg acgggtcgtc gtagcttttc 1140
tggtagtcgt tccggttccc ggtcggagcg ctcgggggtcc acatgtggga cggaggagg 1200
gtccttctct actggttctt ggtccacagg gactggacgg accacttccc gaagatgggg 1260
tcgctgtagc ggacacctac cctctcgttg ccggtcggac tcttgttgat gttctggtgg 1320
ggagggcacg acctgtcgtt gccgtcgaag aaggacatgt cggccgactg gcacctgttc 1380
tcggccaccg tccttccgtt gcagaaatcg acgtcgcact acgtgctccg ggacgtgttg 1440
gtgatgtggg tcttctcggg ctcggacagg gacctgttct acaagaccca cgaccaccac 1500
caccgcccc acgaccggac gatgtcggac gacctgtc accggaagta gtagaaaacc 1560
cacgcctcgt tcgcctcgtc tccgccggtg tcgctgatgt acttgactg ggggtctgcc 1620
ggaccggggg gggccttcgt gatggtcggg atgcgggggt ggtccctgaa acgcgggatg 1680
gccaggccgc ctccgcccc cttcaagtcg tcttcgcggc tgcggggacg gatggtcgtc 1740
ccggtcttag tcgacatgtt gtcgacttg gacctgtctt cccttctcat gctgcaggac 1800
ctattcgcct ctccggccct gggactctac ccgccgttcg gagccgcctt cttgggggtc 1860
cttccggaca tattgcttga cgtctttctg ttctaccggc tccggatgtc gctctagccg 1920
tacttccgc tcgcctccgc ccggttccc gtgctgccgg acatagtccc ggacaggtgg 1980
cgggtggttc tatggatgct gcgggacgtg tacgtccggg acgggggttc c 2031

```

```

<210> 7
<211> 2052
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> sense nucleotide sequence of the 32716CAR(S228P+L235E+N297Q)
construct

```

```

<400> 7
cgatcgcggc ggtggtacga cgacgaccac tggtcggacg acgacacgct cgacgggggtg 60
gggcggaaaag acgactaggg ggtctaagtc gaccacgtct cgccgggcct tgactttttt 120
ggcccgtttt ggcactttta atcgacgttt cgctcgccga tataaaaatg gttgataccg 180

```

tacttgaccc actttgtccg cggcccgttt tcgaaattta cctacccgac ctaattgtgg	240
atatggccgc tttcgtggat atcgcgcta aaatttcg cgaaacgcaa atcggacctt	300
tggtcgcgct cgtggcgcat agacgtataa ttgctagact ttttgcttct atggcgctgg	360
ataaaaacgc gcgcgtgcc gccgatacta ggctaccta taaccccggt cccgtggctg	420
cactggcact cgtcgccgc gccgccgctg ccgccgccgc cgtcgccgcc gccgccgctg	480
ctataacacg actgggtctc gggccgctcg gaccgccact cggaccgggt cgcgcgctgg	540
taatcgacgg cgcgctcgct ttcgcaccta ttgataccgt tgtggaaata cgtaaccata	600
gtcgtctttg gcccggctcg cggtttgac gactaaatag cgcgctcggt ggacctttcg	660
ccgtaaggcc gcgcgaaatc gccgctcgcc tcggcggtgc taaaatggga ctggttaattg	720
ggccaccttc gcctactaca ccgctggata ataacggctg tctcgttgct tctaggcggc	780
tggaaaccgc gcccggtggt tgaccttgac tttctctcgt tcatgccggg agggacgggg	840
ggaacgggac ggggggtcaa gctccgcct gggtcgaca aggacaagg ggggttcggg	900
ttctgtggg actactagtc ggcctggggg ctccactgga cgcaccacca cctgcaactg	960
gtccttctag ggctccaggt caagttaacc atgcacctgc cgcaccttca cgtgttgctg	1020
ttctgttgct gggtctctct tgtcaaggty tcgtggatgg cccaccacag acacgactgg	1080
cacgacgtgg tcctgaccga cttgccgttt cttatgttca cgttccacag gttgttccc	1140
gacgggctgt cgtagctttt ctggtagtgc ttccgggtcc cggtcggagc gctcggggtc	1200
cacatgtggg acggagggag ggtccttctc tactggttct tgggtccacag ggactggacg	1260
gaccttcc cgaagatggg gtcgctgtag cggcacctca ccctctcgtt gccggtcgga	1320
ctcttgttga tgttctgggt gggagggcac gacctgtcgc tgccgtcgaa gaaggacatg	1380
tcggccgact ggcacctgtt ctcggccacc gtccttccgt tgcagaaatc gacgtcgcac	1440
tacgtgtcc gggacgtgtt ggtgatgtgg gtcttctcgg actcggacag ggacccgttc	1500
tacaagacc acgaccacca ccaccgccc cagcaccgga cgatgtcgga cgaccactgt	1560
caccggaagt agtagaaaac ccacgcctcg ttcgcctcgt ctccgccgtt gtcgctgatg	1620
tacttgact gggggtctgc cggaccgggg tgggccttcg tgatggtcgg gatgcggggt	1680
gggtccctga aacggcggtt ggccaggccg cctcccgcc acttcaagtc gtcttcgcgg	1740
ctcgggggac ggtggtcgt cccggtctta gtcgacatgt tgctcgactt ggacccgtct	1800
tcccttctca tgctgcagga cctattcgcc tctccggccc tgggactcta cccgctgttc	1860
ggagccgct tcttgggggt ccttccggac atattgcttg acgtcttctt gttctaccgg	1920
ctccggatgt cgtctagcc gtacttccc ctcgcctccg cccggttccc ggtgctgccg	1980
gacatagtcc cggacagggt gcggtggttc ctatggatgc tgcgggacgt gtacgtccgg	2040
gacgggggtt cc	2052

<210> 8  
 <211> 2031  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> sense nucleotide sequence of the 26292CAR(S228P+L235E+N297Q) construct

<400> 8  
 cgatcgcggc ggtggtacga cgacgaccac tggtcggacg acgacacgct cgacggggtg 60  
 gggcggaag acgactaggg ggtccacgtc gacgtcgtcg gcccgcgcct tgaccacgcg 120  
 ggcccgcgct cgactttga ctcgacgttt cgtcgcgca tatggaaatg gtcgataacc 180  
 tacttgacct actttgtcgc gggcctagtc ccggacctta cctaaccggc gtaactaggc 240  
 atactatcgc tttgggtaat attggtcttt aaatttctat ttcgctaaga ctggcaccta 300  
 ttttcgtcgt cgtggcgcat atacgtcgac tcgtcggact ggtcgcttct atcgcgccac 360  
 ataataacgc gcgcgccgtt gacctacta ataaccccgg tcccgtggtg ggactggcac 420  
 tcgtcgccgc cgccgccgtc gccgccgccg ccgtcgccgc cgccgccgtc gctacacgtc 480  
 taatgggtct cgggctcgat agaccgccgc tcgggccgcg tttgtaatg gtaattgacg 540  
 gcgcgctcgt tttcgtaatc gtttctagac cgcaccatag tccttttttg cccgttttgg 600  
 ttgtttgacg actaaatcgc gccgtcgtgg gacgtctcgc cgtaaggctc ggcgaaatcg 660  
 ccgtcgccgt cgccgtgggt aaaatgggac tggtaatcgt cggaccttgg ctttctaaaa 720  
 cgctacataa taacggtcgt cgtattgttt ataggcatat ggaaaccgcc gccgtgggtt 780  
 gacctttaat ttctctcgtt catgccggga gggacggggg gaacgggacg ggggctcaag 840  
 ctccgcctg ggtcgacaa ggacaagggg ggggttcgggt tcctgtggga ctactagtcg 900  
 gcctgggggc tccactggac gcaccaccac ctgcactcgg tccttctagg gtcaccagtc 960  
 aagttaacca tgacactgcc gcaccttcac gtgttgcggt tctggttcgg gtctctcctt 1020  
 gtcaagttyt cgtggatggc ccaccacaga cagactggc acgacgtggt cctgaccgac 1080  
 ttgccgtttc ttatgttcac gttccacagg ttgttcccgg acgggtcgtc gtagcttttc 1140  
 tggtagtcgt tccggttccc ggtcggagcg ctcgggggtcc acatgtggga cggagggagg 1200  
 gtccttctct actggttctt ggtccacagg gactggacgg accacttccc gaagatgggg 1260  
 tcgctgtagc ggcacctcac cctctcgttg ccggtcggac tcttgttgat gttctggtgg 1320  
 ggagggcacg acctgtcgtc gccgtcgaag aaggacatgt cggccgactg gcacctgttc 1380  
 tcggccaccg tccttccggt gcagaaatcg acgtcgact acgtgctccg ggacgtgttg 1440  
 gtgatgtggg tcttctcgga ctcggacagg gacctgttct acaagacca cgaccaccac 1500  
 caccgcccc acgaccggac gatgtcggac gacctgtc accggaagta gtagaaaacc 1560  
 cagcctcgt tcgcctcgtc tccgccggtg tcgctgatgt acttgactg ggggtctgcc 1620

Page 10



ggaccggggt gggccttcgt gatggtcggg atgcgggggtg ggtccctgaa acggcggatg 1680  
 gccaggccgc ctccgccc ca tttcaagtcg ttttcgcggc tgcggggacg gatggtcgtc 1740  
 ccggtcttag tcgacatgtt gctcgacttg gaccgtctt cccttctcat gctgcaggac 1800  
 ctattcgcct ctccggccct gggactctac ccgccgttcg gagccgcctt cttgggggtc 1860  
 cttccggaca tattgcttga cgtctttctg ttctaccggc tccggatgtc gctctagccg 1920  
 tacttcccgc tcgcctccgc cccgttcccg gtgctgccgg acatagtccc ggacaggtgg 1980  
 cggtggttcc tatggatgct gcgggacgtg tacgtccggg acggggggttc c 2031

<210> 9

<211> 679

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> amino acid sequence of the 32716CAR(S228P+L235E) construct

<400> 9

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro  
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu  
20 25 30

Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly  
35 40 45

Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly  
50 55 60

Lys Ser Phe Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser  
65 70 75 80

Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr  
85 90 95

Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu His Ile Asn Asp Leu Lys Asn Glu Asp  
100 105 110

Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Gly Gly Tyr Asp Pro Met Asp  
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly  
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr  
145 150 155 160

Page 11

Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile  
 165 170 175  
 Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Asn Thr Phe Met  
 180 185 190  
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 195 200 205  
 Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 210 215 220  
 Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp  
 225 230 235 240  
 Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr  
 245 250 255  
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro  
 260 265 270  
 Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val  
 275 280 285  
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 290 295 300  
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu  
 305 310 315 320  
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 325 330 335  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 340 345 350  
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 355 360 365  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile  
 370 375 380  
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 385 390 395 400  
 Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 405 410 415

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 420 425 430  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 435 440 445  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 450 455 460  
 Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 465 470 475 480  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Met  
 485 490 495  
 Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu  
 500 505 510  
 Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser  
 515 520 525  
 Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly  
 530 535 540  
 Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala  
 545 550 555 560  
 Ala Tyr Arg Ser Gly Gly Gly Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp  
 565 570 575  
 Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn  
 580 585 590  
 Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg  
 595 600 605  
 Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly  
 610 615 620  
 Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu  
 625 630 635 640  
 Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu  
 645 650 655  
 Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His  
 660 665 670

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
675

<210> 10

<211> 672

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> amino acid sequence of the 26292CAR(S228P+L235E) construct

<400> 10

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro  
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu  
20 25 30

Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly  
35 40 45

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Asp  
50 55 60

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr  
65 70 75 80

His Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys  
85 90 95

Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp  
100 105 110

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asn Trp Asp Asp Tyr Trp Gly  
115 120 125

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro  
145 150 155 160

Ser Tyr Leu Ala Ala Ser Pro Gly Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg  
165 170 175

Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro  
180 185 190

Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser  
 195 200 205  
 Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 210 215 220  
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys  
 225 230 235 240  
 Gln Gln His Asn Lys Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
 245 250 255  
 Glu Ile Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
 260 265 270  
 Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
 275 280 285  
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
 290 295 300  
 Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val  
 305 310 315 320  
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
 325 330 335  
 Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
 340 345 350  
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly  
 355 360 365  
 Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
 370 375 380  
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr  
 385 390 395 400  
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
 405 410 415  
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
 420 425 430  
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
 435 440 445

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe  
 450 455 460  
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
 465 470 475 480  
 Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Met Phe Trp Val Leu Val Val Val  
 485 490 495  
 Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile  
 500 505 510  
 Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr  
 515 520 525  
 Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln  
 530 535 540  
 Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Gly Gly Gly  
 545 550 555 560  
 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly  
 565 570 575  
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr  
 580 585 590  
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys  
 595 600 605  
 Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys  
 610 615 620  
 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg  
 625 630 635 640  
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala  
 645 650 655  
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 660 665 670  
 <210> 11  
 <211> 679  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> amino acid sequence of the 32716CAR(S228P+L235E+N297Q) construct

&lt;400&gt; 11

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro  
 1 5 10 15  
 Ala Phe Leu Leu Ile Pro Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu  
 20 25 30  
 Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly  
 35 40 45  
 Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly  
 50 55 60  
 Lys Ser Phe Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser  
 65 70 75 80  
 Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr  
 85 90 95  
 Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu His Ile Asn Asp Leu Lys Asn Glu Asp  
 100 105 110  
 Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Gly Gly Tyr Asp Pro Met Asp  
 115 120 125  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly  
 130 135 140  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr  
 145 150 155 160  
 Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile  
 165 170 175  
 Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Asn Thr Phe Met  
 180 185 190  
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 195 200 205  
 Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 210 215 220  
 Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp  
 225 230 235 240  
 Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr  
 245 250 255  
 Page 17

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro  
 260 265 270  
 Pro Cys Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val  
 275 280 285  
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 290 295 300  
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu  
 305 310 315 320  
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 325 330 335  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 340 345 350  
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 355 360 365  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile  
 370 375 380  
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 385 390 395 400  
 Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 405 410 415  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 420 425 430  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 435 440 445  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 450 455 460  
 Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 465 470 475 480  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Met  
 485 490 495  
 Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu  
 500 505 510



Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser  
515 520 525

Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly  
530 535 540

Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala  
545 550 555 560

Ala Tyr Arg Ser Gly Gly Gly Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp  
565 570 575

Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn  
580 585 590

Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg  
595 600 605

Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly  
610 615 620

Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu  
625 630 635 640

Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu  
645 650 655

Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His  
660 665 670

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
675

<210> 12

<211> 672

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> amino acid sequence of the 26292CAR(S228P+L235E+N297Q) construct

<400> 12

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro  
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu  
20 25 30

Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly  
 35 40 45  
 Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Asp  
 50 55 60  
 Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr  
 65 70 75 80  
 His Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp  
 100 105 110  
 Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asn Trp Asp Asp Tyr Trp Gly  
 115 120 125  
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 130 135 140  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro  
 145 150 155 160  
 Ser Tyr Leu Ala Ala Ser Pro Gly Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg  
 165 170 175  
 Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro  
 180 185 190  
 Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser  
 195 200 205  
 Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 210 215 220  
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys  
 225 230 235 240  
 Gln Gln His Asn Lys Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
 245 250 255  
 Glu Ile Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
 260 265 270  
 Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
 275 280 285

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
 290 295 300  
 Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val  
 305 310 315 320  
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
 325 330 335  
 Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
 340 345 350  
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly  
 355 360 365  
 Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
 370 375 380  
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr  
 385 390 395 400  
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
 405 410 415  
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
 420 425 430  
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
 435 440 445  
 Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe  
 450 455 460  
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
 465 470 475 480  
 Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Met Phe Trp Val Leu Val Val Val  
 485 490 495  
 Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile  
 500 505 510  
 Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr  
 515 520 525  
 Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln  
 530 535 540

Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Gly Gly Gly  
545 550 555 560

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly  
565 570 575

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr  
580 585 590

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys  
595 600 605

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys  
610 615 620

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg  
625 630 635 640

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala  
645 650 655

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
660 665 670

<210> 13  
<211> 229  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 13

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe  
1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
35 40 45

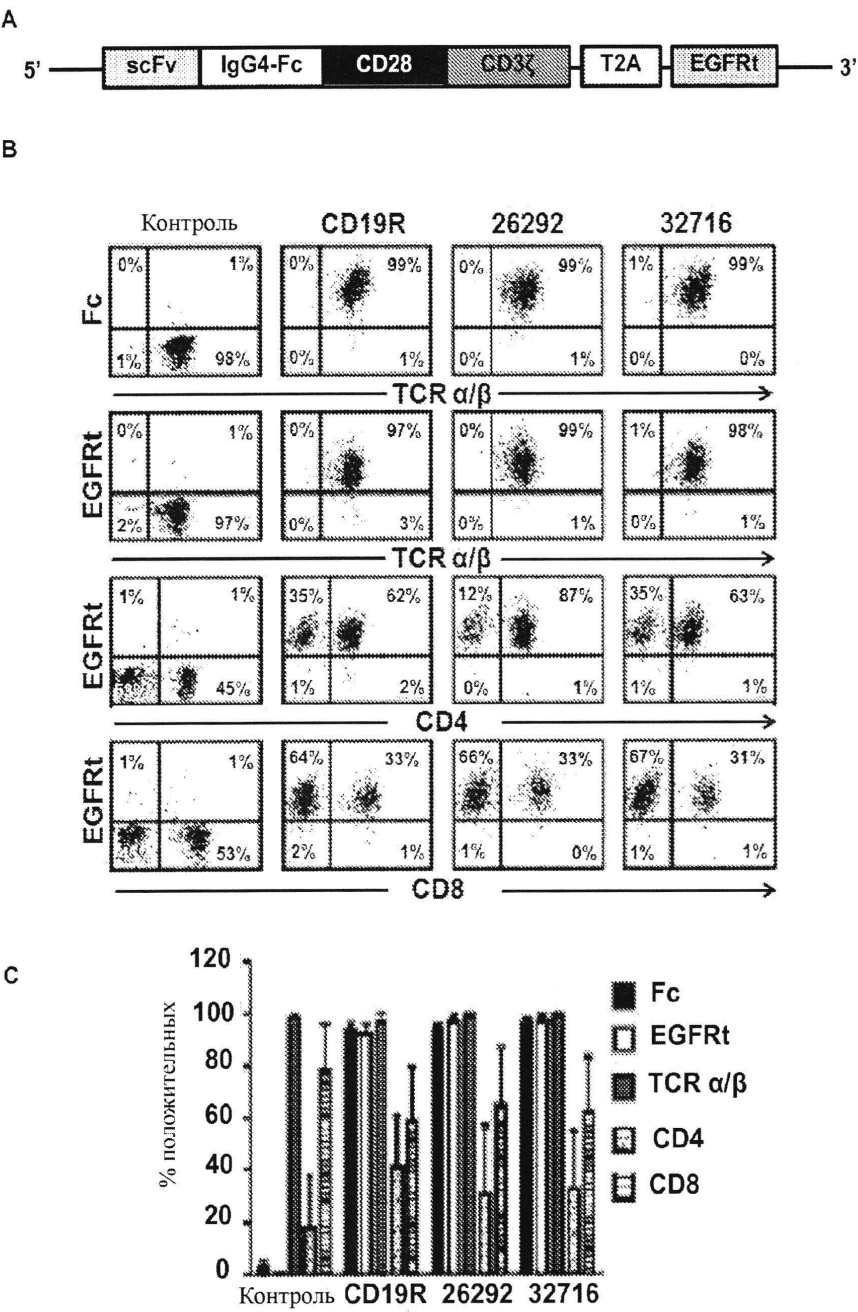
Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser  
65 70 75 80

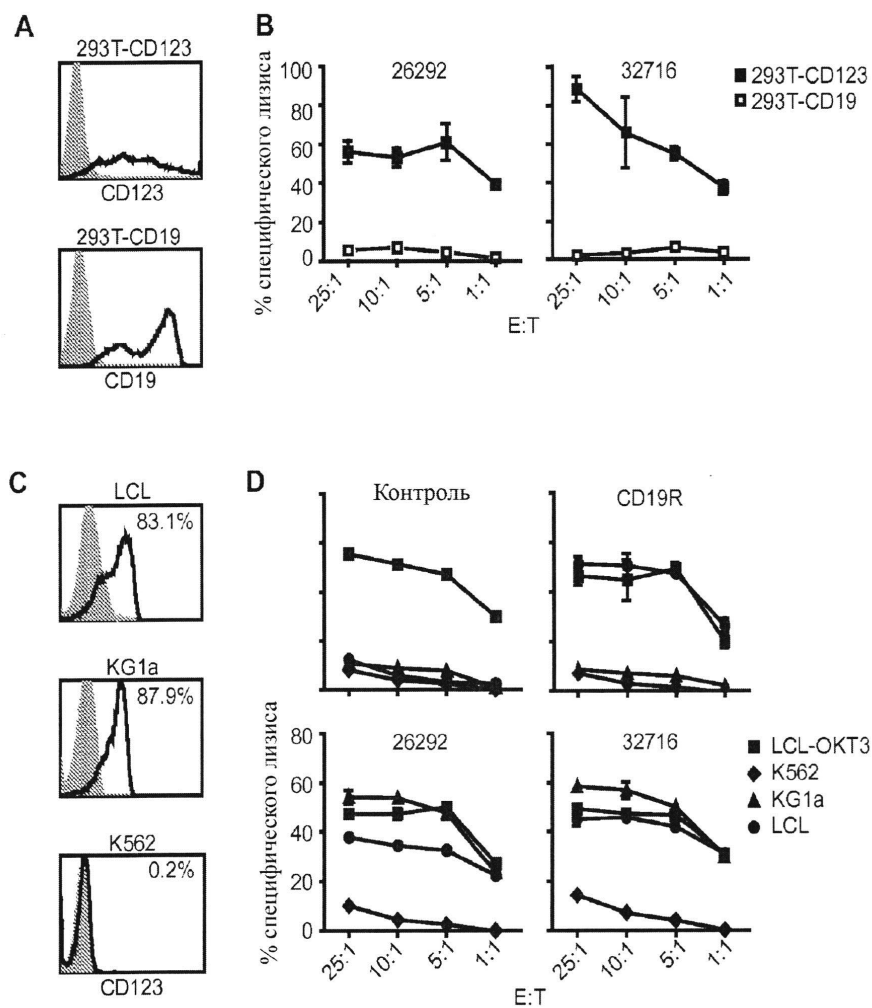
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser  
Page 22

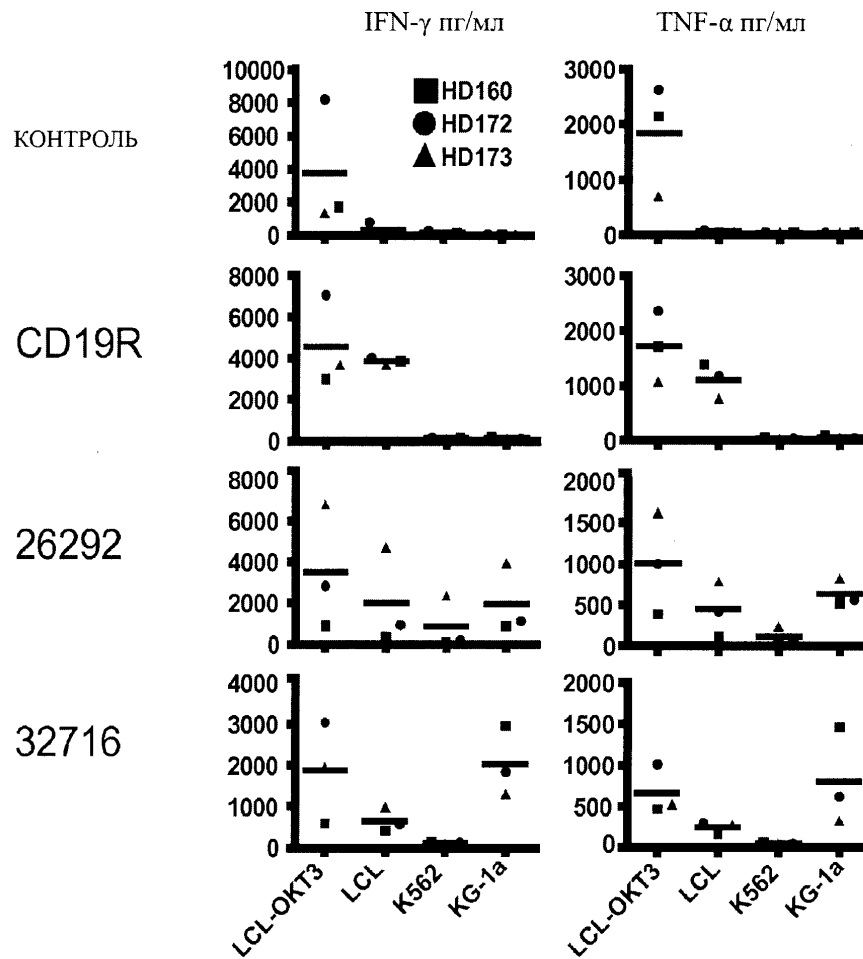
100						105						110					
Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro		
		115					120					125					
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln		
	130					135					140						
Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala		
145					150					155					160		
Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr		
				165					170					175			
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu		
			180					185					190				
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser		
		195					200					205					
Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser		
	210					215					220						
Leu	Ser	Leu	Gly	Lys													
225																	



ФИГ. 1

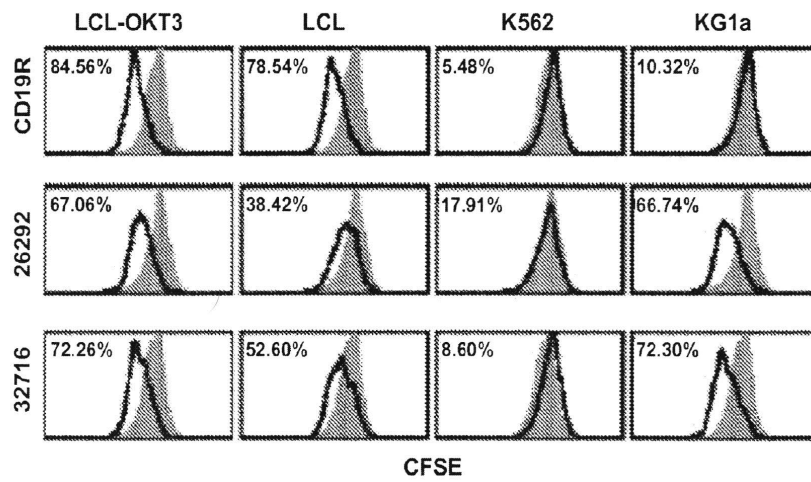


ФИГ. 2

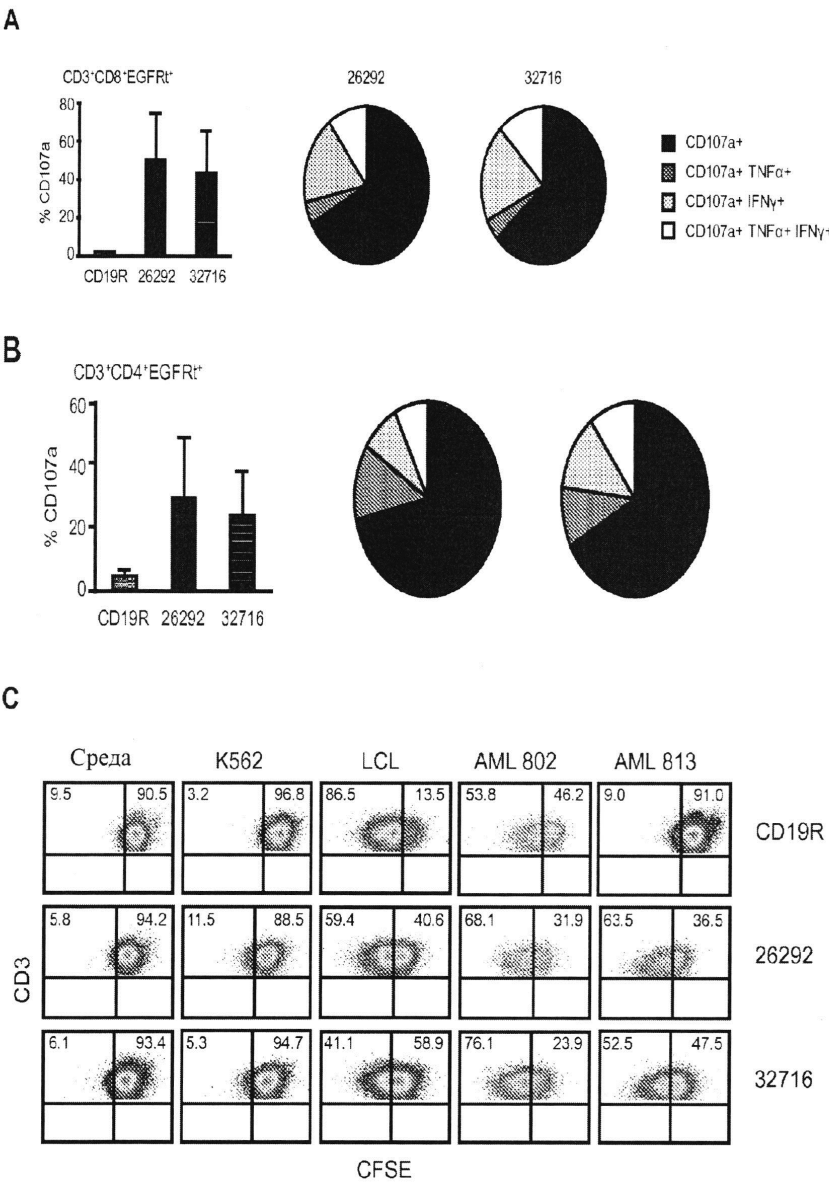


ФИГ. 3А

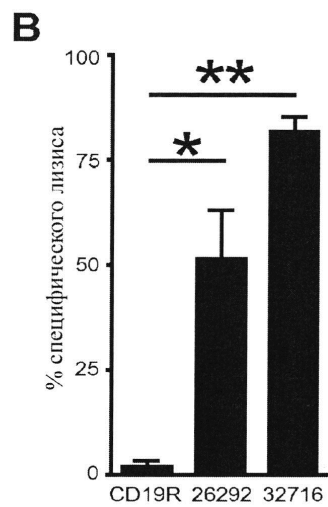
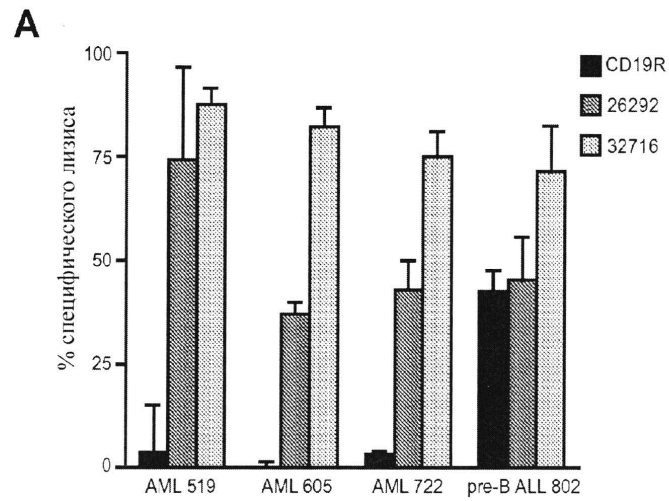




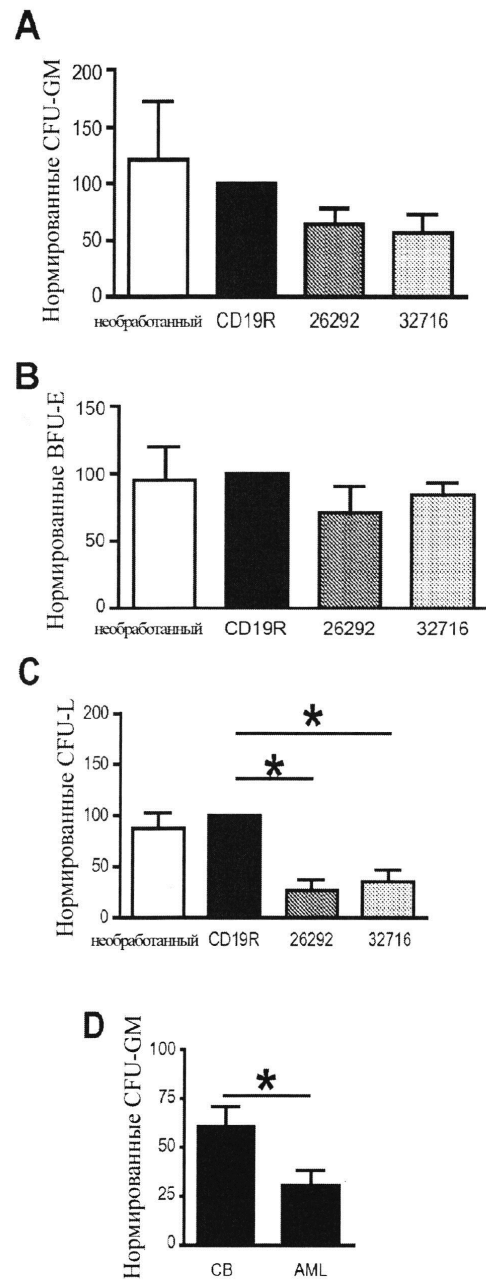
*ФИГ. 3В*



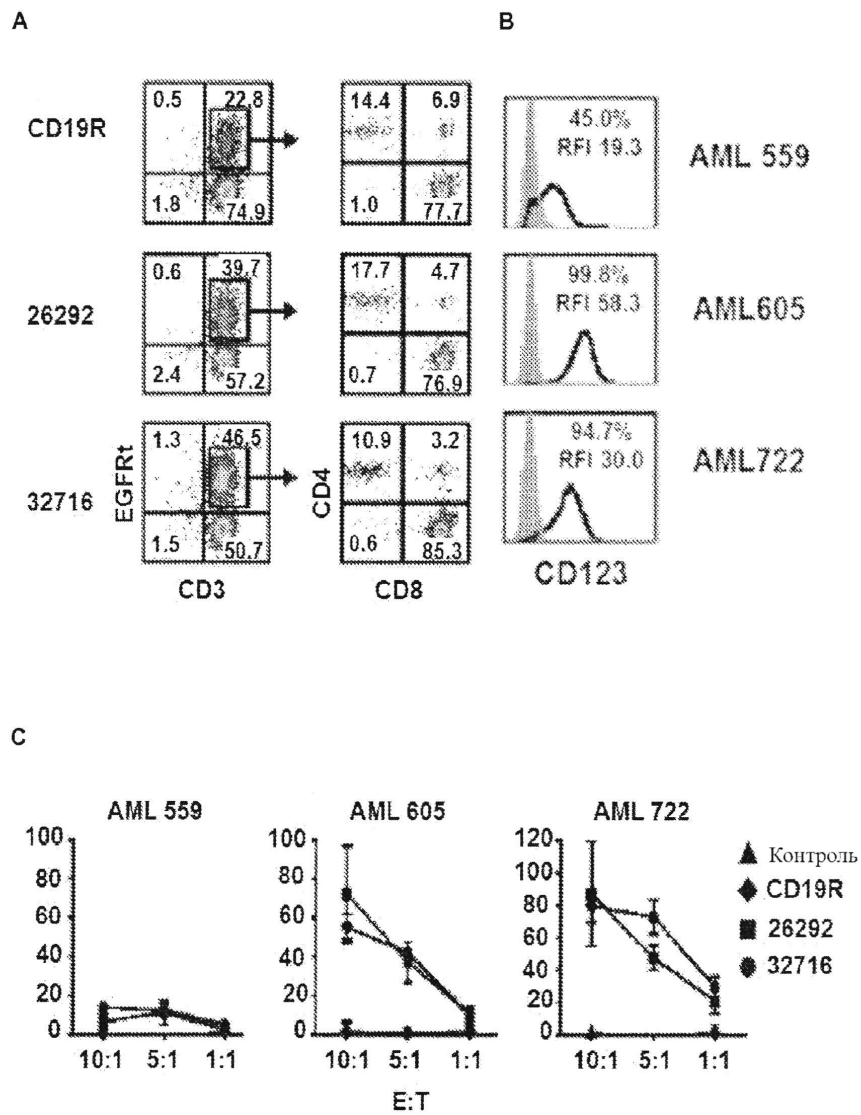
ФИГ. 4



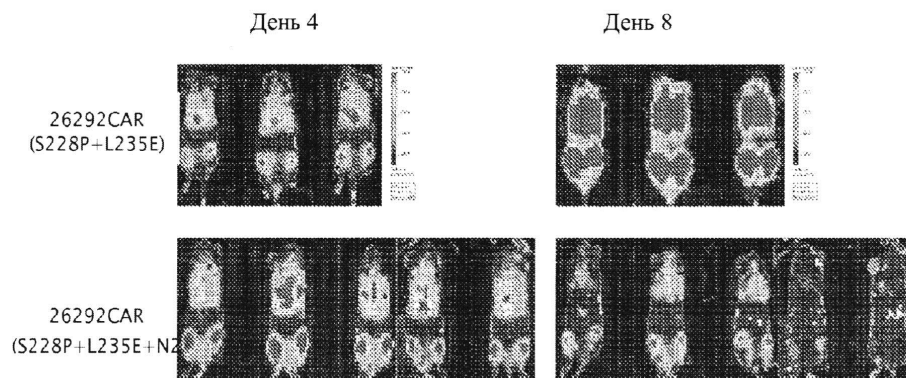
ФИГ. 5



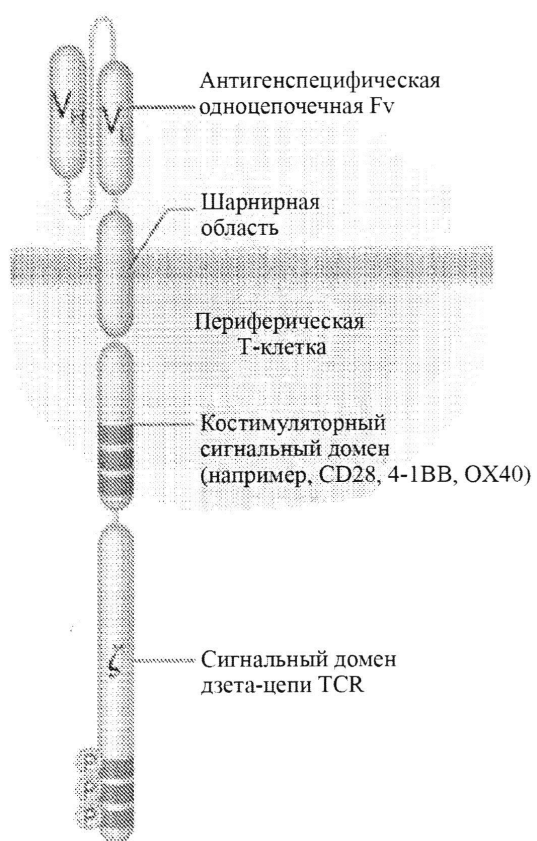
ФИГ. 6



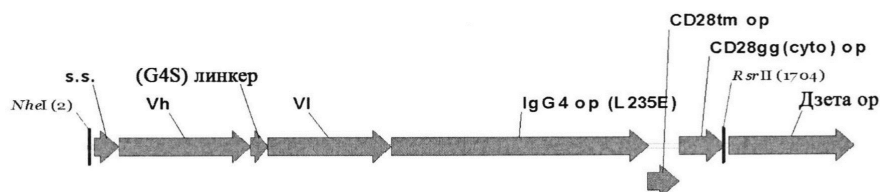
ФИГ. 7



ФИГ. 8



ФИГ. 9



IL3scfv-IgG4(L235E)-CD28gg-Дзета (32716)- до СО

Nhe I		2052 bp	
↓ ~~~~~		Сигнальная последовательность субъединицы альфа GMCSFR →	
		M L L L V T S L L L C E L P H	
1	GCTAGCGCCG	CCACCATGCT	GCTGCTGGTG ACCAGCCTGC TGCTGTGCGA GCTGCCCCAC
	CGATCGCGGC	GGTGGTACGA	CGACGACCAC TGGTCGGACG ACGACACGCT CGACGGGGTG
<b>Vh (32716)→</b>			
	P A F L L I P	Q I Q L V Q S G P E L K K	
61	CCGCGCTTTC	TGCTGATCCC	CCAGATTTCAG CTGGTGCAGA GCGGCCCGGA ACTGAAAAAA
	GGGCGGAAAG	ACGACTAGGG	GGTCTAAGTC GACCACGTCT CGCCGGGCCT TGACTTTTTT
	P G E T V K I	S C K A S G Y I F T N Y G	
121	CCGGGCGAAA	CCGTGAAAAT	TAGCTGCAAA GCGAGCGGCT ATATTTTAC CAACTATGGC
	GGCCCGCTTT	GGCACTTTTA	ATCGACGTTT CGCTCGCCGA TATAAAATG GTTGATACCG
	M N W V K Q A	P G K S F K W M G W I N T	
181	ATGAACTGGG	TGAAACAGGC	GCCGGGCAAA AGCTTTAAAT GGATGGGCTG GATTAACACC
	TACTTGACCC	ACTTTGTCCG	CGGCCCGTTT TCGAAATTTA CCTACCCGAC CTAATTGTGG
	Y T G E S T Y	S A D F K G R F A F S L E	
241	TATACCGGCG	AAAGCACCTA	TAGCGCGGAT TTTAAAGGCC GCTTTGCGTT TAGCCTGGAA
	ATATGGCCGC	TTTCGTGGAT	ATCGCGCCTA AAATTTCGG CGAAACGCAA ATCGGACCTT
	T S A S T A Y	L H I N D L K N E D T A T	
301	ACCAGCGCGA	GCACGCGCTA	TCTGCATATT AACGATCTGA AAAACGAAGA TACCGCGACC
	TGGTCGCGCT	CGTGGCGCAT	AGACGTATAA TTGCTAGACT TTTTGCTTCT ATGGCGCTGG
	Y F C A R S G	G Y D P M D Y W G Q G T S	
361	TATTTTTCGC	CGCGCAGCGG	CGGCTATGAT CCGATGGATT ATTGGGGCCA GGGCACCAGC
	ATAAAAACGC	GCGGTCGCGC	GCCGATACTA GGCTACCTAA TAACCCCGGT CCCGTGGTCG
<b>G4S линкер →</b>			
	V T V S S G G	G G S G G G G S G G G G S	
421	GTGACCGTGA	GCAGCGGCGG	CGGCGGCAGC GGCGGCGGCG GCAGCGGCGG CGGCGGCAGC
	CACTGGCACT	CGTCGCCGCC	GCCGCCGTCG CCGCCGCCGC CGTCGCCGCC GCCGCCGTCG
<b>Vl (32716)→</b>			
	D I V L T Q S	P A S L A V S L G Q R A T	
481	GATATTGTGC	TGACCCAGAG	CCCGGCGAGC CTGGCGGTGA GCCTGGGCCA GCGCGCGACC
	CTATAACAG	ACTGGTCTC	GGGCCGCTCG GACCGCCACT CGGACCCGGT CGCGCGCTGG
	I S C R A S E	S V D N Y G N T F M H W Y	
541	ATTAGCTGCC	GCGCGAGCGA	AAGCGTGGAT AACTATGGCA ACACCTTTAT GCATTGGTAT
	TAATCGACGG	CGCGCTCGCT	TTCGCACCTA TTGATACCGT TGTGGAATA CGTAACCAT
	Q Q K P G Q P	P K L L I Y R A S N L E S	
601	CAGCAGAAAC	CGGGCCAGCC	GCCGAACTG CTGATTTATC GCGCGAGCAA CCTGGAAAGC
	GTCTCTTTG	GCCCGGTCGG	CGGCTTTGAC GACTAAATAG CGCGCTCGTT GGACCTTTTC
	G I P A R F S	G S G S R T D F T L T I N	
661	GGCATTCCGG	CGCGCTTTAG	CGGCAGCGGC AGCCGCACCG ATTTTACCCT GACCATTAA
	CCGTAAGGCC	GCGCGAAATC	GCCGTCGCCG TCGGCGTGGC TAAATGGGA CTGGTAATTG

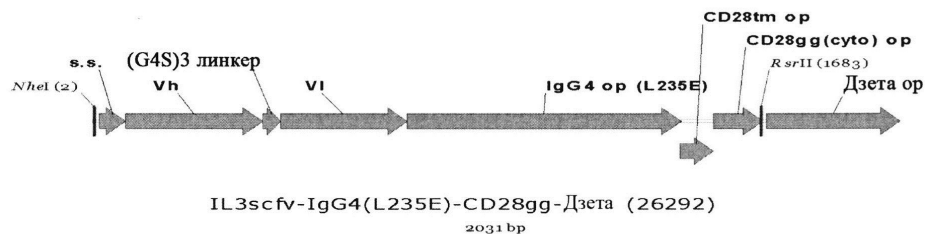
ФИГ. 10



P V E A D D V A T Y Y C Q Q S N E D P P  
 721 CCGGTGGAAG CGGATGATGT GGCGACCTAT TATTGCCAGC AGAGCAACGA AGATCCGCCG  
 GGCCACCTTC GCCTACTACA CCGCTGGATA ATAACGGTCG TCTCGTTGCT TCTAGGCGGC  
IgG4op (L235E)→  
 T F G A G T K L E L K E S K Y G P P C P  
 781 ACCTTTGGCG CGGGACCAA ACTGGAACCTG AAAGAGAGCA AGTACGGCCC TCCCTGCCCC  
 TGGAAACCGC GCCCGTGGTT TGACCTTGAC TTTCTCTCGT TCATGCCGGG AGGGACGGGG  
 [P] C P A P E F [E] G G P S V F L F P P K P  
 841 CCTTGCCCTG CCCCCGAGTT CGAGGGCGGA CCCAGCGTGT TCCTGTTCCC CCCCAGCCCC  
 GGAACGGGAC GGGGGCTCAA GCTCCCGCCT GGGTCGCACA AGGACAAGGG GGGGTTCCGG  
 K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S  
 901 AAGGACACCC TGATGATCAG CCGGACCCCG GAGGTGACCT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC  
 TTCTGTGGG ACTACTAGTC GGCTGGGGG CTCCACTGGA CGCACCAACA CCTGCACTCG  
 Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A  
 961 CAGGAAGATC CCGAGGTCCA GTTCAATTGG TACGTGGACG GCGTGGAAAGT GCACAACGCC  
 GTCCTTCTAG GGCTCCAGGT CAAGTTAACC ATGCACCTGC CGCACCTTCA CGTGTTCGGG  
 K T K P R E E Q F N S T Y R V V S N K G  
 1021 AAGACCAAGC CCAGAGAGGA ACAGTTCAAC AGCACCTACC GGGTGGTGTG TGTGCTGACC  
 TTCTGGTTCG GGTCTCTCCT TGTCAAGTTG TCGTGGATGG CCCACCACAG ACACGACTGG  
 V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G  
 1081 GTGTGCAACC AGGACTGGCT GAACGGCAAA GAATACAAGT GCAAGGTGTC CAACAAGGGC  
 CACGACGTGG TCCTGACCGA CTTGCCGTTT CTTATGTTCG CGTTCACAG GTTGTTCCTG  
 L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q  
 1141 CTGCCCAGCA GCATCGAAAA GACCATCAGC AAGGCCAAGG GCCAGCCTCG CGAGCCCCAG  
 GACGGGTGCT CGTAGCTTTT CTGGTAGTCG TTCCGGTTCC CGGTCCGAGC GCTCGGGGTC  
 V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C  
 1201 GTGTACACCC TGCTCCCTC CCAGGAAGAG ATGACCAAGA ACCAGGTGTC CCTGACCTGC  
 CACATGTGGG ACGGAGGGAG GGTCTTCTC TACTGGTTCT TGGTCCACAG GGACTGGACG  
 L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P  
 1261 CTGGTGAAGG GCTTCTACCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA CGGCCAGCCT  
 GACCACTTCC CGAAGATGGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCTCTCGTT GCCGTCGGA  
 E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y  
 1321 GAGAACAAC AACAAGACCAC CCTCCCGTG CTGGACAGCG ACGGCAGCTT CTTCTGTAC  
 CTCTTGTTGA TGTTCTGGTG GGGAGGGCAC GACCTGTCGC TGCCGTGCAA GAAGGACATG  
 S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V  
 1381 AGCCGGCTGA CCGTGGACAA GAGCCGGTGG CAGGAAGGCA ACGTCTTTAG CTCGACCGTG  
 TCGGCCGACT GGCACCTGTT CTCGGCCACC GTCCTTCCGT TGCAGAAATC GACGTGCGAC  
 M H E A L H N H Y T Q K S L S L S L G K  
 1441 ATGCACGAGG CCCTGCACAA CCACTACACC CAGAAGAGCC TGAGCCTGTC CCTGGGCAAG  
 TACGTGCTCC GGGACGTGTT GGTGATGTGG GTCTTCTCGG ACTCGGACAG GGACCCGTTT  
CD28tm op→  
 M F W V L V V V G G V L A C Y S L L V T  
 1501 ATGTCTCTGG TGCTGGTGGT GGTGGGCGGG GTGCTGGCCT GCTACAGCCT GCTGGTGACA  
 TACAAGACCC ACGACCACCA CCACCCGCCC CACGACCGGA CGATGTCGGA CGACCACTGT  
CD28gg (cyto) op→  
 V A F I I F W V R S K R S R [G G] H S D Y  
 1561 GTGGCCTTCA TCATCTTTTG GGTGCGGAGC AAGCGGAGCA GAGGCGGCCA CAGCGACTAC  
 CACCGGAAGT AGTAGAAAAC CCACGCCCTG TTCGCCTCGT CTCGCCCGGT GTCGCTGATG  
 M N M T P R R P G P T R K H Y Q P Y A P  
 1621 ATGAACATGA CCCCAGACG GCCTGGCCCC ACCCGGAAGC ACTACCAGCC CTACGCCCA  
 TACTGTACT GGGGTCTGC CGGACCGGGG TGGGCCTTCG TGATGGTTCG GATGCGGGGT

**ФИГ. 10**  
**(продолжение)**

37



NheI ↓~~~~~		<b>Сигнальная последовательность субъединицы альфа GMCSFR →</b>	
		M L L L V T S L L L C E L P H	
1	GCTAGCGCCG CCACCATGCT GCTGCTGGTG ACCAGCCTGC TGCTGTGCGA GTCGCCCCAC		
	CGATCGCGGC GGTGGTACGA CGACGACCAC TGGTCGGACG ACGACACGCT CGACGGGGTG		
		<b>Vh (26292) →</b>	
	P A F L L I P Q V Q L Q Q P G A E L V R		
61	CCGCGCTTTC TGCTGATCCC CCAGGTGCAG CTGCAGCAGC CGGGCGCGGA ACTGGTGCGC		
	GGGCGGAAAG ACGACTAGGG GGTCCACGTC GACGTCGTCG GCCCGCGCCT TGACCACGCG		
	P G A S V K L S C K A S G Y T F T S Y W		
121	CCGGGCGCGA GCGTGAAACT GAGCTGCAAA GCGAGCGGCT ATACCTTTAC CAGCTATTGG		
	GGCCCGCGCT CGCACTTTGA CTCGACGTTT CGCTCGCCGA TATGGAAATG GTCGATAACC		
	M N W V K Q R P D Q G L E W I G R I D P		
181	ATGAAGTGGG TGAAACAGCG CCCGGATCAG GGCCTGGAAT GGATTGGCCG CATTGATCCG		
	TACTTGACCC ACTTTGTGCG GGGCCTAGTC CCGGACCTTA CCTAACCGGC GTAACTAGGC		
	Y D S E T H Y N Q K F K D K A I L T V D		
241	TATGATAGCG AAACCCATTA TAACCAGAAA TTTAAAGATA AAGCGATTCT GACCGTGGAT		
	ATACTATCGC TTTGGGTAAT ATTGGTCTTT AAATTTCAT TTCGCTAAGA CTGGCACCTA		
	K S S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V		
301	AAAAGCAGCA GCACCGCGTA TATGCAGCTG AGCAGCCTGA CCAGCGAAGA TAGCGCGGTG		
	TTTTCGTCGT CGTGGCGCAT ATACGTCGAC TCGTCGGACT GGTGCTTCT ATCGCGCCAC		
	Y Y C A R G N W D D Y W G Q G T T L T V		
361	TATTATTGCG CGCGCGGCAA CTGGGATGAT TATTGGGGCC AGGGCACCAC CCTGACCGTG		
	ATAATAACGC GCGCGCCGTT GACCCCTACTA ATAACCCCGG TCCCGTGGTG GGACTGGCAC		
		<b>G4S линкер →</b>	<b>Vl (26292) →</b>
	S S G G G G S G G G G S G G G S D V Q		
421	AGCAGCGGCG GCGGCGGCAG CGGCGGCGGC GGCAGCGGCG GCGGCGGCAG CGATGTGCAG		
	TCGTCGCGCG CGCGCGCGTC GCCGCGCGCG CCGTCGCGCG CGCGCGCGTC GCTACACGTC		
	I T Q S P S Y L A A S P G E T I T I N C		
481	ATTACCCAGA GCGCGAGCTA TCTGGCGGCG AGCCCGGGCG AAACCATTAC CATTAAGTGC		
	TAATGGGTCT CGGGCTCGAT AGACCGCCGC TCGGGCCCGC TTTGGTAATG GTAATTGACG		
	R A S K S I S K D L A W Y Q E K P G K T		
541	CGCGCGAGCA AAAGCATTAG CAAAGATCTG GCGTGGTATC AGGAAAAACC GGGCAAAACC		
	GCGCGCTCGT TTTCTGTAAT GTTTCTAGAC CGCACCATAG TCCTTTTGG CCGCTTTTGG		
	N K L L I Y S G S T L Q S G I P S R F S		
601	AACAAACTGC TGATTTATAG CGGCAGCACC CTGCAGAGCG GCATTCCGAG CCGCTTTAGC		
	TTGTTTGACG ACTAAATATC GCCGTCGTGG GACGTCTCGC CGTAAGGCTC GCGCAAAATCG		
	G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F		
661	GGCAGCGGCA GCGGCACCGA TTTTACCCTG ACCATTAGCA GCCTGGAACC GGAAGATTTT		
	CCGTCGCGGT CGCGGTGGCT AAAATGGGAC TGGTAATCGT CGGACCTTGG CCTTCTAAAA		
	A M Y Y C Q Q H N K Y P Y T F G G G T K		
721	GCGATGTATT ATTGCCAGCA GCATAACAAA TATCCGTATA CCTTTGGCGG CGGCACCAAA		
	CGCTACATAA TAACGGTCGT CGTATTGTTT ATAGGCATAT GGAAACCGCC GCCGTGGTTT		

ФИГ. 11

**IgG4op (L235E) →**

781 L E I K E S K Y G P P C P **P** C P A P E F  
 CTGGAAATTA AAGAGAGCAA GTACGGCCCT CCCTGCCCCC CTTGCCCTGC CCCCAGATTTC  
 GACCTTTAAT TTCTCTCGTT CATGCCGGGA GGGACGGGGG GAACGGGACG GGGGCTCAAG  
**E** G G P S V F L F P P K P K D T L M I S  
 841 GAGGGCGGAC CCAGCGTGT CCTGTTCCCC CCCAAGCCCA AGGACACCCT GATGATCAGC  
 CTCCCGCCTG GGTGCGACAA GGACAAGGGG GGGTTGCGGT TCCTGTGGGA CTACTAGTCG  
 R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q  
 901 CGGACCCCCG AGGTGACCTG CGTGGTGGTG GACGTGAGCC AGGAAGATCC CGAGGTCCAG  
 GCCTGGGGGC TCCACTGGAC GCACCACCAC CTGCACTCGG TCCTTCTAGG GCTCCAGGTC  
 F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E  
 961 TTCAATTGGT ACGTGGACGG CGTGGAAAGTG CACAACGCCA AGACCAAGCC CAGAGAGGAA  
 AAGTTAACCA TGCACCTGCC GCACCTTCAC GTGTTGCGGT TCTGGTTCGG GTCTCTCCTT  
 Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L  
 1021 CAGTTCAACA GCACCTACCG GGTGGTGTCT GTGCTGACCG TGCTGCACCA GGACTGGCTG  
 GTCAAGTTGT CGTGGATGGC CCACCACAGA CACGACTGGC ACGACGTGGT CCTGACCGAC  
 N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K  
 1081 AACGGCAAAG AATACAAGTG CAAGGTGTCC AACAAGGGCC TGCCAGCAG CATCGAAAAG  
 TTGCCGTTTC TTATGTTTAC GTTCCACAGG TTGTTCCCGG ACGGGTCGTC GTAGCTTTTC  
 T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S  
 1141 ACCATCAGCA AGGCCAAGGG CCAGCCTCGC GAGCCCCAGG TGTACACCTC GCCTCCCTCC  
 TGGTAGTCGT TCCGTTTCCC GGTCCGAGCG CTCGGGGTCC ACATGTGGGA CGGAGGGAGG  
 Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P  
 1201 CAGGAAGAGA TGACCAAGAA CCAGGTGTCC CTGACCTGCC TGGTGAAGGG CTTCTACCCC  
 GTCCTTCTCT ACTGGTTCTT GGTCCACAGG GACTGGACGG ACCACTTCCC GAAGATGGGG  
 S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T  
 1261 AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAC GGCCAGCCTG AGAACAACCTA CAAGACCACC  
 TCGCTGTAGC GGCACCTCAC CCTCTCGTTG CCGGTCCGAC TCTTGTGTAT GTTCTGGTGG  
 P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K  
 1321 CCTCCCGTGC TGGACAGCGA CGGCAGCTTC TTCCTGTACA GCCGGCTGAC CGTGGACAAG  
 GGAGGGCACG ACCTGTCTGT GCCGTGCAAG AAGGACATGT CGGCCGACTG GCACCTGTTC  
 S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N  
 1381 AGCCCGTGGC AGGAAGGCAA CGTCTTTAGC TGCAGCGTGA TGCACGAGGC CCTGCACAAC  
 TCGGCCACCG TCCTTCCGTT GCAGAAATCG ACGTCGCACT ACGTGCTCCG GGACGTGTTG

**CD28tm op →**

1441 H Y T Q K S L S L S L G K M F W V L V V  
 CACTACACCC AGAAGAGCCT GAGCCTGTCC CTGGGCAAGA TGTCTGGGT GCTGGTGGTG  
 GTGATGTGGG TCTTCTCGGA CTCGGACAGG GACCCGTTCT ACAAGACCCA CGACCACCAC  
 V G G V L A C Y S L L V T V A F I I F W  
 1501 GTGGGCGGGG TGCTGGCCTG CTACAGCCTG CTGGTGACAG TGGCCTTCAT CATCTTTTGG  
 CACCCGCCCC ACGACCGGAC GATGTCGGAC GACCACTGTC ACCGGAAGTA GTAGAAAACC

**CD28gg (cyto) op →**

1561 V R S K R S R **G G** H S D Y M N M T P R R  
 GTGCGGAGCA AGCGGAGCAG AGGCGGCCAC AGCGACTACA TGAACATGAC CCCCAGACGG  
 CACGCCCTGT TCGCCTCGTC TCCGCCGGTG TCGCTGATGT ACTTGTACTG GGGGTCTGCC  
 P G P T R K H Y Q P Y A P P R D F A A Y  
 1621 CCTGGCCCCA CCGGAAGCA CTACCAGCCC TACGCCCCAC CCAGGGACTT TGCCGCCTAC  
 GGACCGGGGT GGCCTTCGT GATGGTCGGG ATGCGGGGTG GGTCCCTGAA ACGGCGGATG  
 RsrII  
 ~~~~~↓

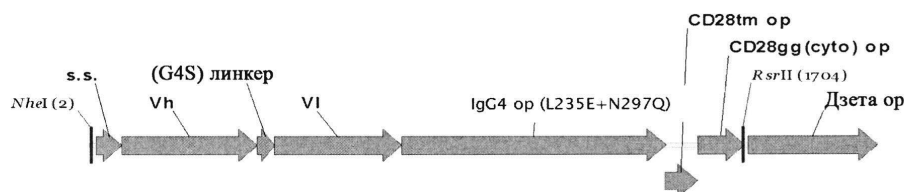
**Дзета op →**

1681 R S G G G R V K F S R S A D A P A Y Q Q  
 CGGTCCGGCG GAGGGCGGGT GAAGTTCAGC AGAAGCGCCG ACGCCCCTGC CTACCAGCAG  
 GCCAGGCCCG CTCCGCCCA CTTCAAGTCG TCTTCGCGGC TGCGGGGACG GATGGTCGTC

**ФИГ. 11**  
 (продолжение)

G Q N Q L Y N E L N L G R R E E Y D V L  
 1741 GGCCAGAATC AGCTGTACAA CGAGCTGAAC CTGGGCAGAA GGGAAGAGTA CGACGTCCTG  
 CCGGTCTTAG TCGACATGTT GCTCGACTTG GACCCGTCTT CCCTTCTCAT GCTGCAGGAC  
 D K R R G R D P E M G G K P R R K N P Q  
 1801 GATAAGCGGA GAGGCCGGGA CCCTGAGATG GGCGGCAAGC CTCGGCGGAA GAACCCCCAG  
 CTATTCGCCT CTCCGGCCCT GGGACTCTAC CCGCCGTTCG GAGCCGCCTT CTGGGGGGTC  
 E G L Y N E L Q K D K M A E A Y S E I G  
 1861 GAAGGCCCTGT ATAACGAACT GCAGAAAGAC AAGATGGCCG AGGCCTACAG CGAGATCGGC  
 CTTCGGGACA TATTGCTTGA CGTCTTTCTG TTCTACCGGC TCCGGATGTC GCTCTAGCCG  
 M K G E R R R G K G H D G L Y Q G L S T  
 1921 ATGAAGGGCG AGCGGAGGCG GGGCAAGGGC CACGACGGCC TGTATCAGGG CCTGTCCACC  
 TACTTCCCGC TCGCCTCCGC CCGTTCOCG GTGCTGCCGG ACATAGTCCC GGACAGGTGG  
 A T K D T Y D A L H M Q A L P P R  
 1981 GCCACCAAGG ATACCTACGA CGCCCTGCAC ATGCAGGCCG TGCCCCCAAG G  
 CCGTGGTTCC TATGGATGCT GCGGGACGTG TACGTCCGGG ACGGGGGTTC C

**ФИГ. 11**  
(продолжение)



IL3scfv-IgG4 (L235E+N297Q)-CD28gg-Дзета (32716) -до СО

2052 bp

NheI  
↓~~~~~

**Сигнальная последовательность субъединицы альфа GMCSFR →**

М L L L V T S L L L C E L P H

1 GCTAGCGCCG CCACCATGCT GCTGTGGTG ACCAGCCTGC TGCTGTGCGA GCTGCCCCAC  
CGATCGCGGC GGTGGTACGA CGACGACCAC TGGTCGGACG ACGACACGCT CGACGGGGTG

**Vh (32716) →**

Р A F L L I P Q I Q L V Q S G P E L K K

61 CCCGCCTTTC TGCTGATCCC CCAGATTTCAG CTGGTGCGA GCGGCCCGGA ACTGAAAAAA  
GGCGGAAAG ACGACTAGGG GGTCTAAGTC GACCACGTCT CGCCGGGCCT TGACTTTTTT  
P G E T V K I S C K A S G Y I F T N Y G

121 CCGGGCGAAA CCGTGAATA TAGCTGCAAA GCGAGCGGCT ATATTTTAC CAACTATGGC  
GGCCCGCTT GGCACTTTA ATCGACGTTT CGCTCGCCGA TATAAAAATG GTTGATACCG  
M N W V K Q A P G K S F K W M G W I N T

181 ATGAACTGGG TGAACAGGC GCCGGGCAAA AGCTTTAAAT GGATGGGCTG GATTAACACC  
TACTTGACCC ACTTTGTCCG CGGCCCGTTT TCGAAATTTA CCTACCCGAC СТААТТГТГГ  
Y T G E S T Y S A D F K G R F A F S L E

241 TATACCGGCG AAAGCACCTA TAGCGCGGAT TTTAAAGGCC GCTTGGCGTT TAGCCTGGAA  
ATATGGCCGC TTTCGTGGAT ATCGCGCCTA AAATTTCCGG CGAAACGCAA ATCGGACCTT  
T S A S T A Y L H I N D L K N E D T A T

301 ACCAGCGCGA GCACCGCGTA TCTGCATATT AACGATCTGA AAAACGAAGA TACCGCGACC  
TGGTCGCGCT CGTGGCGCAT AGACGTATAA TTGCTAGACT TTTTGCTTCT ATGGCGCTGG  
Y F C A R S G G Y D P M D Y W G Q G T S

361 TATTTTTCG CGCGCAGCGG CGGCTATGAT CCGATGGATT ATTGGGGCCA GGGCACCAGC  
ATAAAAACGC GCGCGTCGCC GCCGATACTA GGCTACCTAA TAACCCCGGT CCCGTGGTGC

**G4S линкер →**

V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S

421 GTGACCGTGA GCAGCGGCGG CGGCGGCAGC GCGCGCGCGG GCAGCGGCGG CGGCGGCAGC  
CACTGGCACT CGTCGCCGCG GCCGCCGTGC CCGCGCCCGC CGTCGCCGCG GCCGCCGTGC

**Vl (32716) →**

D I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T

481 GATATTGTGC TGACCCAGAG CCCGGCGAGC CTGGCGGTGA GCCTGGGCCA GCGCGCGACC  
CTATAACACG ACTGGGTCTC GGGCCGCTCG GACCGCCACT CGGACCCGGT CGCGCGCTGG  
I S C R A S E S V D N Y G N T F M H W Y

541 ATTAGCTGCC GCGCGAGCGA AAGCGTGGAT AACTATGGCA ACACCTTTAT GCATTGGTAT  
TAATCGACGG CGCGCTCGCT TTCGCACCTA TTGATACCGT TGTGGAATA CGTAACCATA  
Q Q K P G Q P P K L L I Y R A S N L E S

601 CAGCAGAAAC CGGGCCAGCC GCCGAAACTG CTGATTTATC GCGCGAGCAA CCTGGAAAGC  
GTCGTCTTTG GCCCGGTCGG CGGCTTTGAC GACTAAATAG CGCGCTCGTT GGACCTTTCG  
G I P A R F S G S G S R T D F T L T I N

661 GGCATTCCGG CGCGCTTTAG CGGCAGCGGC AGCCGCACCG ATTTTACCCT GACCATTAAC  
CCGTAAGGCC GCGCGAAATC GCCGTCGCCG TCGGCGTGGC TAAATGGGA CTGGTAATTG

ФИГ. 12

P V E A D D V A T Y Y C Q Q S N E D P P  
 721 CCGGTGGAAG CGGATGATGT GGCACCTAT TATTGCCAGC AGAGCAAACGA AGATCCGCCG  
 GGCCACCTTC GCCTACTACA CCGCTGGATA ATAACGGTCG TCTCGTTGCT TCTAGGCGGC

IgG4op (L235E+NJ297Q) →

T F G A G T K L E L K E S K Y G P P C P  
 781 ACCTTTGGCG CGGGCACCAA ACTGGAAC TGACCTTGAC TTTCTCTCGT TCATGCCGGG AGGGACGGGG  
 TGGAAACCGC GCCCGTGGTT **P** C P A P E F **E** G G P S V F L F P P K P  
 841 CCTTGCCTG CCCCCGAGTT CGAGGGCGGA CCCAGCGTGT TCCTGTTCCT CCCCAGGCC  
 GGAACGGGAC GGGGGCTCAA GCTCCCGCT GGGTCGCACA AGGACAAGGG GGGGTTCGGG  
 K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S  
 901 AAGGACACCC TGATGATCAG CCGGACCCCC GAGGTGACCT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC  
 TTCCTGTGGG ACTACTAGTC GGCCTGGGGG CTCCACTGGA CGCACCACCA CCTGCACTCG  
 Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A  
 961 CAGGAAGATC CCGAGGTCCA GTTCAATTGG TACGTGGACG GCGTGGGAAGT GCACAACGCC  
 GTCTTCTAG GGCTCCAGGT CAAGTTAACC ATGCACCTGC CGCACCTTCA CGTGTTCGGG  
 K T K P R E E Q F **Q** S T Y R V V S V L T  
 1021 AAGACCAAGC CCAGAGAGGA ACAGTTCAR AGCACCTACC GGGTGGTGTC TGTGCTGACC  
 TTCTGGTTCG GGTCTCTCCT TGTCAAGGTY TCGTGGATGG CCCACCACAG ACACGACTGG  
 V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G  
 1081 GTGCTGCACC AGGACTGGCT GAACGGCAAA GAATACAAGT GCAAGGTGTC CAACAAGGGC  
 CACGACGTGG TCCTGACCGA CTTGCCGTTT CTTATGTTCA CGTTCACAG GTTGTTCCTCG  
 L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q  
 1141 CTGCCACGA GCATCGAAAA GACCATCAGC AAGGCCAAGG GCCAGCCTCG CGAGCCCCAG  
 GACGGGTCGT CGTAGCTTTT CTGGTAGTCG TTCGGTTCC CGGTCCGAGC GCTCGGGGTC  
 V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C  
 1201 GTGTACACCC TGCCTCCCTC CCAGGAAGAG ATGACCAAGA ACCAGGTGTC CCTGACCTGC  
 CACATGTGGG ACGGAGGGAG GGTCTTCTC TACTGGTTCT TGGTCCACAG GGACTGGACG  
 L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P  
 1261 CTGGTGAAGG GCTTCTACCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA CGGCCAGCCT  
 GACCACTTCC CGAAGATGGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT GCCGGTCGGA  
 E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y  
 1321 GAGAACAAC AACAAGACCAC CCCTCCCGTG CTGGACAGCG ACGGCAGCTT CTTCTGTAC  
 CTCTTGTGA TGTCTGGTG GGGAGGGCAC GACCTGTGCG TGCCGTCGAA GAAGGACATG  
 S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V  
 1381 AGCCGGCTGA CCGTGGACAA GAGCCGGTGG CAGGAAGGCA ACGTCTTTAG CTGCAGCGTG  
 TCGGCCGACT GGCACCTGTT CTCGGCCACC GTCCTTCCGT TGCAGAAATC GACGTGCGAC  
 M H E A L H N H Y T Q K S L S L S L G K  
 1441 ATGCACGAGG CCCTGCACAA CCACTACACC CAGAAGAGCC TGAGCCTGTC CCTGGGCAAG  
 TACGTGCTCC GGGACGTGTT GGTGATGTGG GTCTTCTCGG ACTCGGACAG GGACCCGTTT

CD28tm op →

M F W V L V V V G G V L A C Y S L L V T  
 1501 ATGTTCTGGG TGCTGGTGGT GGTGGGCGGG GTGCTGGCCT GCTACAGCCT GCTGGTGACA  
 TACAAGACCC ACGACCACCA CCACCCGCCC CACGACCGGA CGATGTCGGA CGACCACTGT

CD28gg (cyto) op →

V A F I I F W V R S K R S R **G G** H S D Y  
 1561 GTGGCCTTCA TCATCTTTTG GGTGCGGAGC AAGCGGAGCA GAGGCGGCA CAGCGACTAC  
 CACCGGAAGT AGTAGAAAAC CCACGCCTCG TTCGCCTCGT CTCCGCCGGT GTCGCTGATG  
 M N M T P R R P G P T R K H Y Q P Y A P  
 1621 ATGAACATGA CCCCCAGACG GCCTGGCCCC ACCCGGAAGC ACTACCAACC CTACGCCCCA  
 TACTTGTACT GGGGTCTGCG CGGACCGGGG TGGCCCTTCG TGATGGTCCG GATGCGGGGT

**ФИГ. 12**  
**(продолжение)**

RsrII                      ~~~~~~↓                      Дзета оп →

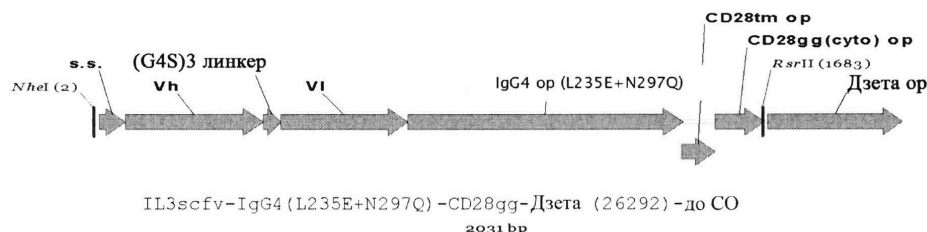
```

      P R D F A A Y   R S G   G G R V K F S   R S A
1681 CCCAGGGACT TTGCCGCCTA CCGGTCCGGC GGAGGGCGGG TGAAGTTCAG CAGAAGCGCC
      GGGTCCCTGA AACGGCGGAT GGCCAGGCCG CCTCCGCCCC ACTTCAAGTC GTCTTCGCGG
      D A P A Y Q Q   G Q N   Q L Y N E L N   L G R
1741 GACGCCCCCTG CCTACCAGCA GGGCCAGAAT CAGCTGTACA ACGAGCTGAA CCTGGGCAGA
      CTGCGGGGAC GGATGGTCGT CCCGGTCTTA GTCGACATGT TGCTCGACTT GGACCCGTCT
      R E E Y D V L   D K R   R G R D P E M   G G K
1801 AGGGAAGAGT ACGACGTCCT GGATAAGCGG AGAGGCCGGG ACCCTGAGAT GGGCGGCAAG
      TCCCTTCTCA TGCTGCAGGA CCTATTGCGC TCTCCGCCCC TGGGACTCTA CCCGCCGTTC
      P R R K N P Q   E G L   Y N E L Q K D   K M A
1861 CCTCGGCGGA AGAACCCCA GGAAGGCCTG TATAACGAAC TGCAGAAAGA CAAGATGGCC
      GGAGCCGCCT TCTTGGGGGT CCTTCCGGAC ATATTGCTTG ACGTCTTTCT GTTCTACCGG
      E A Y S E I G   M K G   E R R R G K G   H D G
1921 GAGGCCTACA GCGAGATCGG CATGAAGGGC GAGCGGAGGC GGGGCAAGGG CCACGACGGC
      CTCCGGATGT CGCTCTAGCC GTACTTCCCG CTCGCCTCCG CCCCGTTCCC GGTGCTGCCG
      L Y Q G L S T   A T K   D T Y D A L H   M Q A
1981 CTGTATCAGG GCCTGTCCAC CGCCACCAAG GATACCTACG ACGCCCTGCA CATGCAGGCC
      GACATAGTCC CGGACAGGTG GCGGTGGTTC CTATGGATGC TCGGGACGT GTACGTCCGG
      L P P R
2041 CTGCCCCCAA GG
      GACGGGGGTT CC

```

**ФИГ. 12**  
(продолжение)





| NheI<br>↓ ~~~~~ |            | Сигнальная последовательность субъединицы альфа GMCSFR → |             |            |            |            |            |            |             |             |            |            |   |
|-----------------|------------|----------------------------------------------------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|---|
|                 |            | M                                                        | L           | L          | L          | V          | T          | S          | L           | L           | L          | C          | E |
| 1               | GCTAGCGCCG | CCACCATGCT                                               | GCTGCTGGTG  | ACCAGCCTGC | TGCTGTGCGA | GCTGCCCCAC | CGATCGCGGC | GGTGGTACGA | CGACGACCAC  | TGGTCGGACG  | ACGACACGCT | CGACGGGGTG |   |
|                 |            | <b>Vh (26292) →</b>                                      |             |            |            |            |            |            |             |             |            |            |   |
|                 |            | P                                                        | A           | F          | L          | L          | I          | P          | Q           | V           | Q          | L          | Q |
| 61              | CCCGCCTTTC | TGCTGATCCC                                               | CCAGGTGCAG  | CTGCAGCAGC | CGGGCGCGGA | ACTGGTGCGC | GGGCGGAAAG | ACGACTAGGG | GGTCCACGTC  | GACGTCGTCG  | GCCCGCGCCT | TGACCACGCG |   |
|                 |            | P                                                        | G           | A          | S          | V          | K          | L          | S           | C           | K          | A          | S |
| 121             | CCGGGCGCGA | GCGTGAAACT                                               | GAGCTGCAAA  | GCGAGCGGCT | ATACCTTTAC | CAGCTATTGG | GGCCCGCGCT | CGCACTTTGA | CTCGACGTTT  | CGCTCGCCGA  | TATGGAAATG | GTGATAAACC |   |
|                 |            | M                                                        | N           | W          | V          | K          | Q          | R          | P           | D           | Q          | G          | L |
| 181             | ATGAAGTGGG | TGAAACAGCG                                               | CCCGGATCAG  | GGCCTGGAAT | GGATTGGCCG | CATTGATCCG | TACTTGACCC | ACTTTGTCGC | GGGCCTAGTC  | CCGGACCTTA  | CCTAACCGGC | GTAAC TAGG |   |
|                 |            | Y                                                        | D           | S          | E          | T          | H          | Y          | N           | Q           | K          | F          | K |
| 241             | TATGATAGCG | AAACCCATTA                                               | TAACCAGAAA  | TTTAAAGATA | AAGCGATTCT | GACCGTGGAT | ATACTATCGC | TTTGGGTAAT | ATTGGTCTTT  | AAATTCTCTAT | TTCGCTAAGA | CTGGCACCTA |   |
|                 |            | K                                                        | S           | S          | S          | T          | A          | Y          | M           | Q           | L          | S          | S |
| 301             | AAAAGCAGCA | GCACCGCGTA                                               | TATGCAGCTG  | AGCAGCCTGA | CCAGCGAAGA | TAGCGCGGTG | TTTTCGTCGT | CGTGGCGCAT | ATACGTGCGAC | TCGTGCGGACT | GGTCGCTTCT | ATCGCGCCAC |   |
|                 |            | Y                                                        | Y           | C          | A          | R          | G          | N          | W           | D           | D          | Y          | W |
| 361             | TATTATTGCG | CGCGCGGCAA                                               | CTGGGATGAT  | TATTGGGGCC | AGGGCACCAC | CCTGACCGTG | ATAATAACGC | GCGCGCCGTT | GACCC TACTA | ATAACCCCGG  | TCCCGTGGTG | GGACTGGCAC |   |
|                 |            | <b>G4S линкер →</b>                                      |             |            |            |            |            |            |             |             |            |            |   |
|                 |            | S                                                        | S           | G          | G          | G          | G          | S          | G           | G           | G          | G          | S |
| 421             | AGCAGCGGCG | GCGGCGGCAG                                               | CGGCGGCGGC  | GGCAGCGGCG | GCGGCGGCAG | CGATGTGCAG | TCGTGCGCGC | CGCGCGCGTC | GCCGCGCGCG  | CCGTGCGCGC  | CGCGCGCGTC | GCTACACGTC |   |
|                 |            | I                                                        | T           | Q          | S          | P          | S          | Y          | L           | A           | A          | S          | P |
| 481             | ATTACCCAGA | GCCCGAGCTA                                               | TCTGGCGGCG  | AGCCCGGGCG | AAACCATTAC | CATTAACTGC | TAATGGGTCT | CGGGCTCGAT | AGACCGCGCG  | TCGGGCGCGC  | TTTGGTAATG | GTAATTGACG |   |
|                 |            | R                                                        | A           | S          | K          | S          | I          | S          | K           | D           | L          | A          | W |
| 541             | CGCGCGAGCA | AAAGCATTAG                                               | CAAAGATCTG  | GCGTGGTATC | AGGAAAAACC | GGGCAAAACC | GCGCGCTCGT | TTTCGTAATC | GTTCTTAGAC  | CGCACCATAG  | TCCTTTTGG  | CCGTTTGG   |   |
|                 |            | N                                                        | K           | L          | L          | I          | Y          | S          | G           | S           | T          | L          | Q |
| 601             | AACAAACTGC | TGATTTATAG                                               | CGGCAGCACC  | CTGCAGAGCG | GCATTCCGAG | CCGCTTTAGC | TTGTTTGACG | ACTAAATATC | GCCGTCGTGG  | GACGTCTCGC  | CGTAAGGCTC | GGCGAAATCG |   |
|                 |            | G                                                        | S           | G          | S          | G          | T          | D          | F           | T           | L          | T          | I |
| 661             | GGCAGCGGCA | GCGGCACCGA                                               | TTTTACCCCTG | ACCATTAGCA | GCCTGGAACC | GGAAGATTTT | CCGTCGCGGT | CGCCGTGGCT | AAAATGGGAC  | TGGTAATCGT  | CGGACCTTGG | CCTTCTAAAA |   |
|                 |            | A                                                        | M           | Y          | Y          | C          | Q          | Q          | H           | N           | K          | Y          | P |
| 721             | GCGATGTATT | ATTGCCAGCA                                               | GCATAACAAA  | TATCCGTATA | CCTTTGGCGG | CGGCACCAAA | CGTACATAA  | TAACGGTCTG | CGTATTGTTT  | ATAGGCATAT  | GGAAACCGCC | GCCGTGGTTT |   |

ФИГ. 13

**IgG4op (L235E) →**

L E I K E S K Y G P P C P **P** C P A P E F  
 781 CTGGAAATTA AAGAGAGCAA GTACGGCCCT CCCTGCCCCC CTTGCCCTGC CCCCAGTTTC  
 GACCTTTAAT TTCTCTCGTT CATGCCGGGA GGGACGGGGG GAACGGGACG GGGGCTCAAG  
**E** G G P S V F L F P P K P K D T L M I S  
 841 GAGGGCGGAC CCAGCGTGT CCGTGTCCCC CCAAGCCCA AGGACACCCT GATGATCAGC  
 CTCCCGCCTG GGTGCGACAA GGACAAGGGG GGGTTCGGGT TCCTGTGGGA CTACTAGTCG  
 R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q  
 901 CGGACCCCGG AGGTGACCTG CGTGGTGGTG GACGTGAGCC AGGAAGATCC CGAGGTCCAG  
 GCCTGGGGGC TCCACTGGAC GCACCACCAC CTGCACTCGG TCCTTCTAGG GCTCCAGGTC  
 F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E  
 961 TTCAATTGGT ACGTGGACGG CGTGGAAGTG CACAACGCCA AGACCAAGCC CAGAGAGGAA  
 AAGTTAACCA TGCACCTGCC GCACCTTCAC GTGTTGCGGT TCTGGTTCGG GTCTCTCCTT  
 Q F **G** S T Y R V V S V L T V L H Q D W L  
 1021 CAGTTCAARA GCACCTACCG GGTGGTGTCT GTGCTGACCG TGCTGCACCA GGAAGTGGCTG  
 GTCAAGTTCT CGTGGATGGC CCACCACAGA CACGACTGGC ACGACGTGGT CCTGACCGAC  
 N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K  
 1081 AACGGCAAAG AATACAAGTG CAAGGTGTCC AACAAGGGCC TGCCCGAGCAG CATCGAAAAG  
 TTGCCGTTTC TTATGTTTAC GTTCCACAGG TTGTTCCCGG ACGGGTCGTC GTAGCTTTTC  
 T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S  
 1141 ACCATCAGCA AGGCCAAGGG CCAGCCTCGC GAGCCCCAGG TGTACACCTT GCCTCCCTCC  
 TGGTAGTCGT TCCGGTTCCC GGTCCGAGCG CTCGGGGTCC ACATGTGGGA CGGAGGGAGG  
 Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P  
 1201 CAGGAAGAGA TGACCAAGAA CCAGGTGTCC CTGACCTGCC TGGTGAAGGG CTTCTACCCC  
 GTCCTTCTCT ACTGTTCTT GGTCCACAGG GACTGGACGG ACCACTTCCC GAAGATGGGG  
 S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T  
 1261 AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAC GGCCAGCCTG AGAACAACCA CAAGACCACC  
 TCGCTGTAGC GGCACCTCAC CCTCTCGTTG CCGGTCGGAC TCTTGTGTAT GTTCTGGTGG  
 P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K  
 1321 CCTCCCGTGC TGGACAGCGA CGGCAGCTTC TTCTGTGACA GCCGGCTGAC CGTGGACAAG  
 GGAGGGCAGC ACCTGTCTGT GCCGTGGAAG AAGGACATGT CGGCCGACTG GCACCTGTTC  
 S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N  
 1381 AGCCCGTGGC AGGAAGGCAA CGTCTTTAGC TGCAGCGTGA TGCACGAGGC CCTGCACAAC  
 TCGGCCACCG TCCTTCCGTT GCAGAAATCG ACGTCGCACT ACGTGCTCCG GGACGTGTTG

**CD28tm op →**

H Y T Q K S L S L S L G K M F W V L V V  
 1441 CACTACACCC AGAAGAGCCT GAGCCTGTCC CTGGGCAAGA TGTTCTGGGT GCTGGTGGTG  
 GTGATGTGGG TCTTCTCGGA CTCGGACAGG GACCCGTCTT ACAAGACCCA CGACCACCAC  
 V G G V L A C Y S L L V T V A F I I F W  
 1501 GTGGGCGGGG TGCTGGCCTG CTACAGCCTG CTGGTGACAG TGGCCTTCAT CATCTTTTGG  
 CACCCGCCCC ACGACCGGAC GATGTCGGAC GACCACTGTC ACCGGAAGTA GTAGAAAACC

**CD28gg (cyto) op →**

V R S K R S R **G G** H S D Y M N M T P R R  
 1561 GTGCGGAGCA AGCGGAGCAG AGGCGGCCAC AGCGACTACA TGAACATGAC CCCCAGACGG  
 CACGCCTCGT TCGCCTCGTC TCCGCCGGTG TCGCTGATGT ACTTGTACTG GGGGTCTGCC  
 P G P T R K H Y Q P Y A P P R D F A A Y  
 1621 CCTGGCCCCA CCCGGAAGCA CTACCAGCCC TACGCCCCAC CCAGGGACTT TGCCGCTTAC  
 GGACCGGGGT GGGCCTTCGT GATGGTCGGG ATGCGGGGTG GGTCCCTGAA ACGGCGGATG

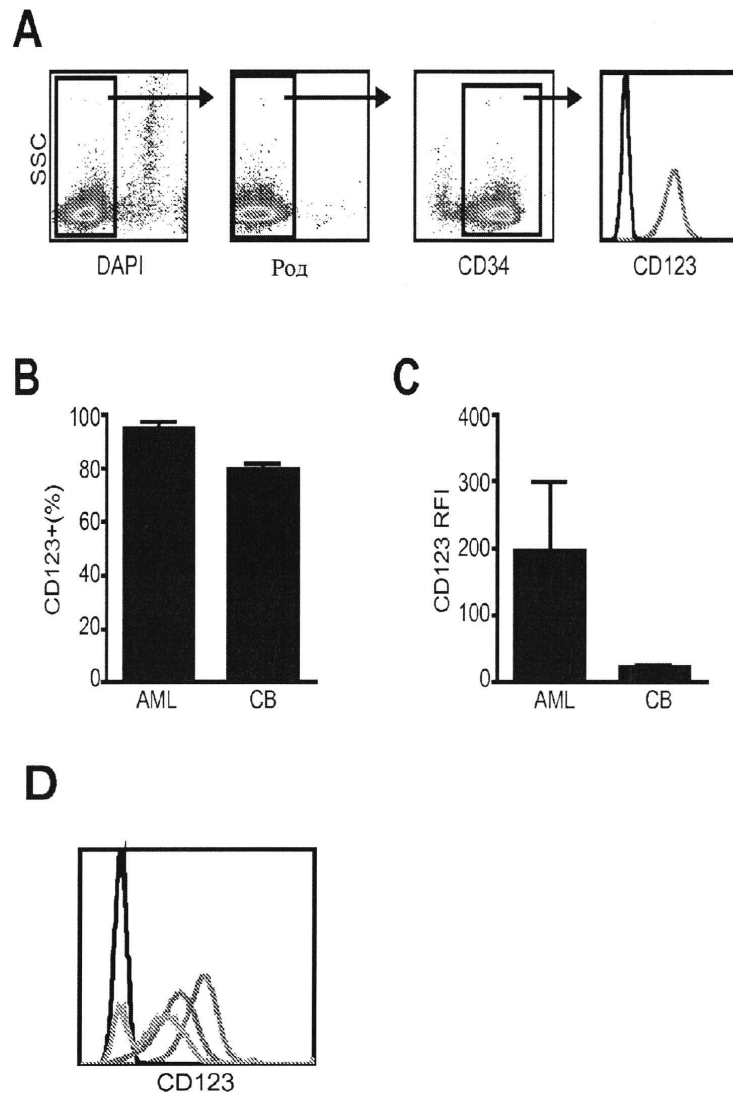
**Дзета op →**

R S G G G R V K F S R S A D A P A Y Q Q  
 1681 CGGTCGGGCG GAGGGCGGGT GAAGTTCAGC AGAAGCGCCG ACGCCCCTGC CTACCAGCAG  
 GCCAGGCCGC CTCCGCCCCA CTCAAGTCG TCTTCGCGGC TGCGGGGACG GATGGTCGTC

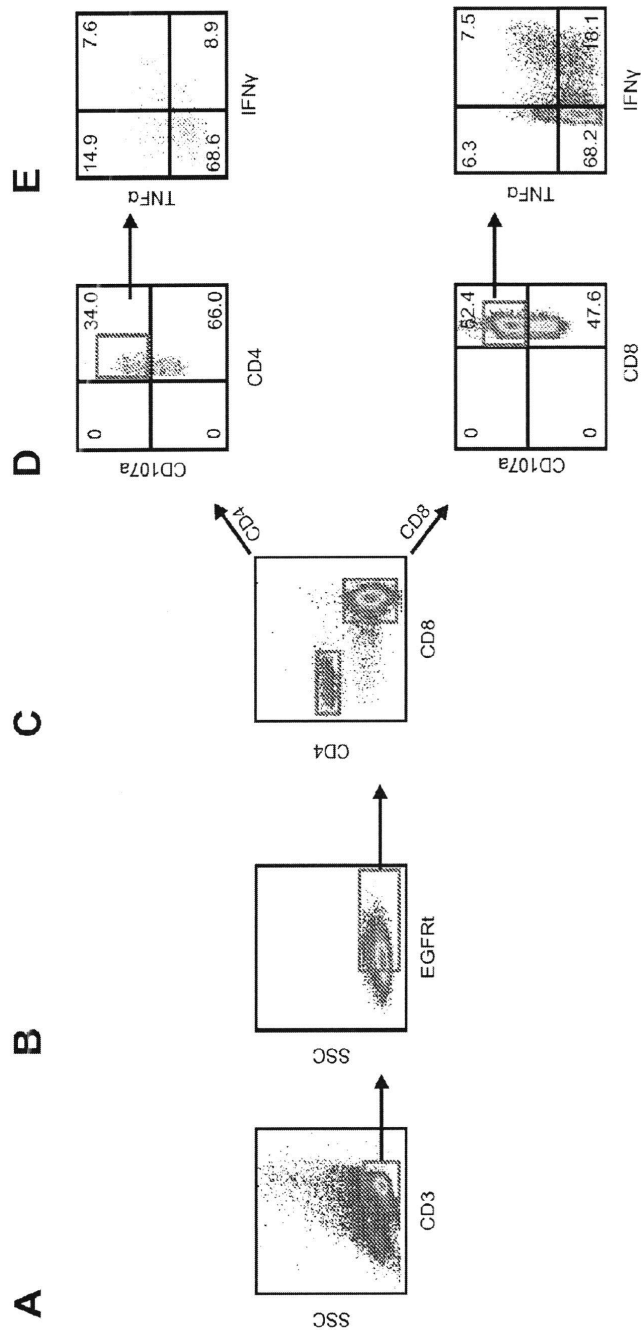
**ФИГ. 13**  
(продолжение)

G Q N Q L Y N E L N L G R R E E Y D V L  
 1741 GGCCAGAATC AGCTGTACAA CGAGCTGAAC CTGGGCAGAA GGGAAGAGTA CGACGTCCTG  
 CCGGTCTTAG TCGACATGTT GCTCGACTTG GACCCGTCTT CCCTTCTCAT GCTGCAGGAC  
 D K R R G R D P E M G G K P R R K N P Q  
 1801 GATAAGCGGA GAGGCCGGGA CCCTGAGATG GGCGGCAAGC CTCGGCGGAA GAACCCCCAG  
 CTATTCGCCT CTCCGGCCCT GGGACTCTAC CCGCCGTTCG GAGCCGCCTT CTTGGGGGTC  
 E G L Y N E L Q K D K M A E A Y S E I G  
 1861 GAAGGCCTGT ATAACGAACT GCAGAAAGAC AAGATGGCCG AGGCCTACAG CGAGATCGGC  
 CTTCCGGACA TATTGCTTGA CGTCTTTCTG TTCTACCGGC TCCGGATGTC GCTCTAGCCG  
 M K G E R R R G K G H D G L Y Q G L S T  
 1921 ATGAAGGGCG AGCGGAGGCG GGGCAAGGCG CACGACGGCC TGTATCAGGG CCTGTCCACC  
 TACTTCCCGC TCGCCTCCGC CCCGTTCCCG GTGCTGCCGG ACATAGTCCC GGACAGGTGG  
 A T K D T Y D A L H M Q A L P P R  
 1981 GCCACCAAGG ATACCTACGA CGCCCTGCAC ATGCAGGCCC TGCCCCAAG G  
 CGGTGGTTCC TATGGATGCT GCGGGACGTG TACGTCCGGG ACGGGGGTTC C

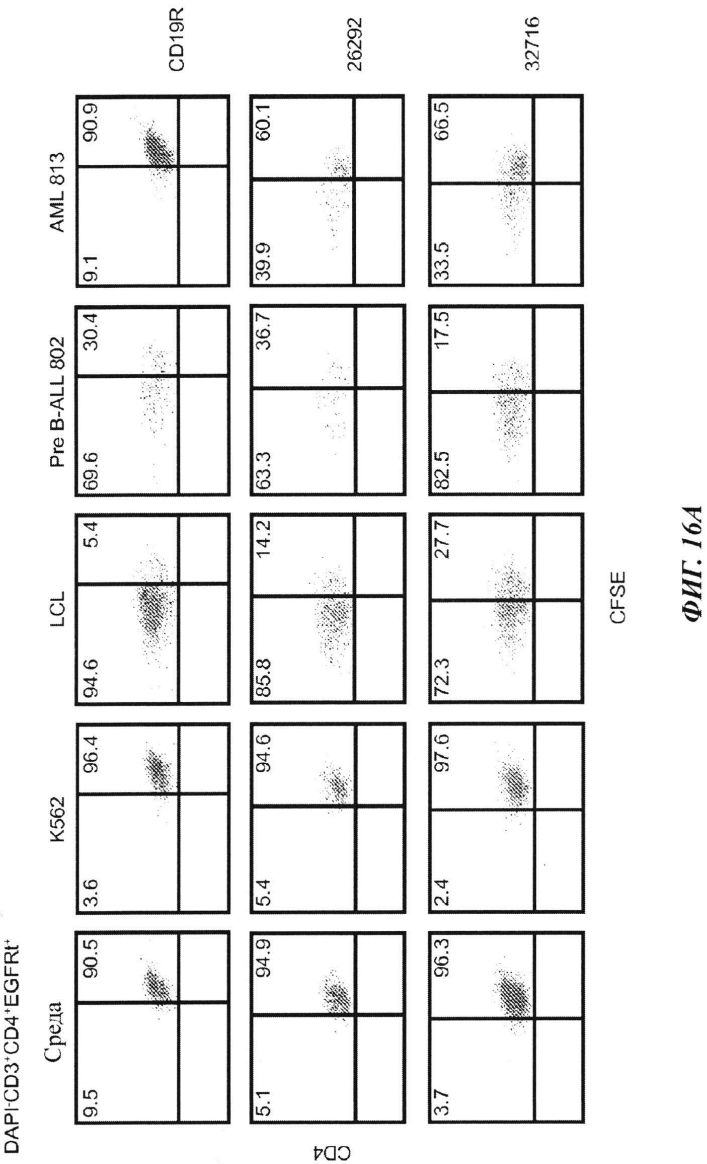
**ФИГ. 13**  
(продолжение)

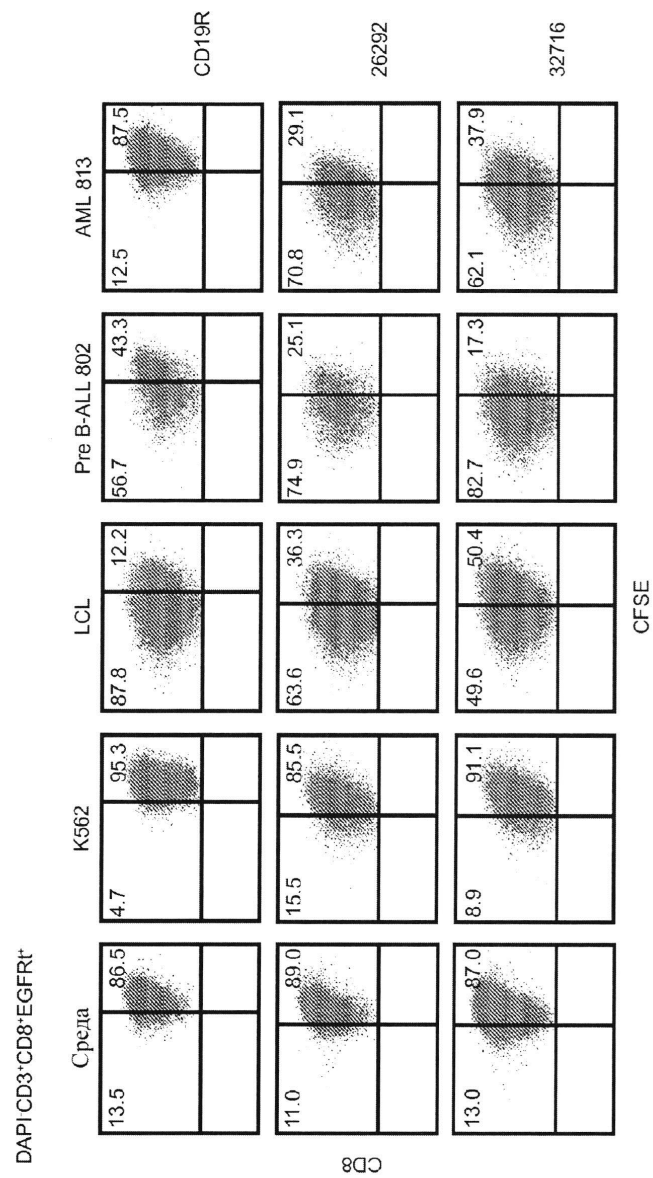


**ФИГ. 14**



ФИГ. 15





ФИГ. 16В