



(51) МПК
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)

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:
14.03.2014Дата 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 анг. - М.: Мир,
2000, стр.10-13. EA 9873 B1, 28.04.2008.

RU 271114 C2

RU 271114 C2

**(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⁺, 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

R U 2 7 1 1 1 4 C 2

R U 2 7 1 1 1 4

лизировать аутологичные AML-бласты *in vitro*.
Наконец, одна доза $5,0 \times 10^6$ CAR123-Т-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 4 C 2

R U 2 7 1 1 1 4 C 2

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19)

RU (11)

2 711 114⁽¹³⁾ C2

(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⁺, 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 5.0×10^6 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).

22 cl, 16 dwg, 1 tbl, 2 ex

R U 2 7 1 1 1 4 C 2

R U 2 7 1 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.

5 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

10 [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.

15 [0004] 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.

20 [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.

25 [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

30 интерлейкина 3 (IL-3Ra; CD123), для лечения AML, и они продемонстрировали перспективную противолейкемическую активность на мышиных 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 плазмоцитоидных дендритных

35 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

40 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.

45 [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, TAA) 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 ζ , и могут включать костимуляторный эндодомен [5]. Несколько групп разработали CAR, нацеленные на различные антигены, для лечения В-клеточных злокачественных

5 новообразований [6-10], и многие продолжают оценивать CAR-экспрессирующие Т-клети 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, 10 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 15 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 20 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 25 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 30 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 35 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 40 в здоровых донорских Т-клетках (CD4/CD8) CD123CAR перенацеливают Т-клеточную специфичность и опосредованную мощную эффекторную активность в отношении клеточных линий CD123 $^+$, а также первичных образцов от пациентов с AML. CD123CAR-Т-клетки существенно не изменяют образование колоний гранулоцитов/макрофагов и 45 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 50 модифицированы для экспрессии генов CD123CAR и способны лизировать аутологичные AML- blasts *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 5 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 10 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 15 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 20 модифицированную шарнирную область IgG4, модифицированный трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домен CD28 и сигнальный домен CD3 ζ . Также указана последовательность рибосомального проскока T2A и маркер трансдукции укороченный EGFR (рецептора эпидермального фактора роста, EGFRt). (В) Репрезентативный фенотип 25 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- 30 коньюгированным стрептавидином и анти-TCRa/β, 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 35 селекцией и одним циклом размножения. Данные представляют собой средние значения ± SEM.

[0012] На фиг. 2 показано, что CD123-специфичные CAR-экспрессирующие Т-клетки лизируют CD123-экспрессирующие опухолевые клеточные линии. (А) Проточная 40 цитометрия клеток 293T, временно трансфицированных для экспрессии CD123 (наверху, черная линия) или CD19 (внизу, черная линия). Исходные ложно-трансдуцированные 293T-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) 45 против 293T-клеток, экспрессирующих либо CD123 (293T-CD123), либо CD19 (CD19-293T), в анализе высвобождения хрома. Данные представляют средние значения от трех лунок + SD. (С) Проточная цитометрия CD123 на линии AML-клеток KG1a, линии EBV-трансформированных LCL-клеток и линии CML-клеток K562. В каждой 50 гистограмме указан процент клеток, положительных на CD123-окрашивание (черная линия), в сравнении с изотипическими контролями (серая заштрихованная). (Д) Специфическая цитотоксичность CD123-CAR-Т-клеток (26292 и 32716) против клеточной

линии $CD19^+CD123^+$ LCL и клеточной линии $CD19^-CD123^+$ KG1a в анализе высвобождения хрома. OKT3-экспрессирующие клеточные линии LCL (LCL-OKT3) и $CD19^-CD123^-$ K562 были использованы в качестве положительной и отрицательной 5 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- γ и TNF- α и пролиферируют в ответ на CD123-экспрессирующие клетки-мишени. CD123-CAR-T-клетки или контрольные парные Т-клетки от трех здоровых доноров 10 культивировали совместно с указанными клеточными линиями в течение 24 часов в соотношении E:T=10:1, и высвобождение INF- γ и TNF- α количественно оценивали с помощью методики Luminex multiplex bead. (В) Парные CFSE-меченные CD19- или CD123-специфичные Т-клетки культивировали совместно с указанными стимуляторными 15 клеточными линиями в течение 96 часов в соотношении E:T=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 эфекторных функций CD123-специфичными CAR с последующим совместным культивированием с первичными 20 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- γ и TNF- α . (А, столбчатые диаграммы) Процент DAPI $^-$ CD3 $^+$ CD8 $^+$ EGFR $^+$ -клеток, экспрессирующих CD107a. Данные представляют собой 25 средние значения + S.D. (А, круговые диаграммы). Фракции CD3 $^+$ CD8 $^+$ EGFR $^+$ -клеток, подвергающихся дегрануляции и продуцирующих INF- γ и/или TNF- α , нанесены на круговые диаграммы. (В) Данные популяции DAPI $^-$ CD3 $^+$ CD4 $^+$ EGFR $^+$ из того же 30 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 E:T=2:1 и анализировали с помощью 35 проточной цитометрии по разведению CFSE в популяции DAPI $^-$ CD3 $^+$ EGFR $^+$. Клеточные линии LCL и 562 служат положительными и отрицательными 27 контролями, соответственно. Пре-B-ALL 802 является первичным образцом от пациента, дважды 40 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 51 Cr-меченными CD34 $^+$ 45 первичными AML-образцами в соотношении E:T=25:1. Клеточные линии LCL и K562 служат положительным и отрицательным контролем, соответственно. Пре-B-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 лейкемические клетки-предшественники *in vitro*. (А и В) Клети пуповинной

крови CD34⁺ (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 E:T=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 ± SEM для трех различных образцов CB. (C) CD34⁺ 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 E:T=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 ± 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 CB 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-мишениях, используемых в анализе высвобождения ⁵¹Cr. Указан процент CD123⁺-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 ⁵¹Cr-меченых аутологичных CD34-обогащенных бластов в качестве клеток-мишней. 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")¹), вместе с нуклеотидной

⁵ 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.

¹⁰ [0022] На фиг. 12 показана схема конструкции 32716CAR, имеющей мутацию L235E, мутацию S228P и мутацию N297Q ("32716CAR(S228P+L235E+N297Q")¹), 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

¹⁵ 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")¹), 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 ³⁰ AML-клетках. Клетки гейтировали по популяции DAPI⁻CD34⁺ и оценивали экспрессию CD123 (черный - изотипический контроль, красный - анти-CD123). (B) Процент CD123-положительных клеток, экспрессированных в популяции DAPI⁻CD34⁺. Каждая точка представляет собой отдельный образец. (C)

³⁵ Относительный показатель флуоресценции (RFI) CD123 в популяции DAPI⁻CD34⁺. 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.

⁴⁰ [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 ⁴⁵ после совместного культивирования с AML 373. (A) Начальное гейтирование установлено на CD3⁺-клетки. (B) Вторичное гейтирование, установленное с помощью флуоресценции минус один контроль, установлено на EGFRt⁺-клетки. (C) Третичное

гейтирование установлено на CD4⁺- и CD8⁺-популяции. (D) Финальное гейтирование установлено на CD107a⁺-клетки. (E) Продукция IFN- γ и TNF- α в популяциями CD107a⁺. Квадранты установлены с помощью меченых образцов изотипического контроля. В 5 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. 10 5С. После первоначального гейтирования на DAPI/CD3⁺EGFRt⁺-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 15 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 20 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 25 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, 30 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 35 сигнальный домен (фиг. 9).

[0031] Анти-CD123-scFv-область может включать нуклеотидную последовательность, которая при экспрессии может связывать эпигоп 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]. 40 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

45 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 20 варианльному белку или пептиду, в котором серин в позиции 228 заменен пролином.

25 [0035] Аминокислотные замены могут быть получены путем мутации, например, конкретный кодон в нуклеиновокислотной последовательности, кодирующй 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:

45

Глицин	75
Аланин	89
Серин	105
Пролин	115

5	Валин	117
	Треонин	119
	Цистеин	121
	Лейцин	131
	Изолейцин	131
	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, 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.

20 [0040] 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: 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).

25 [0041] В некоторых воплощениях модифицированная шарнирная область получена из шарнирной области IgG4, имеющей следующую аминокислотную последовательность:

Позиция 219 ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTP E VTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWY Позиция 279 VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVSVLTV
30 LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK Позиция 339

35 AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE
NNYKTTPPV розиция 399 DSDGSFFLYS LTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ
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, но не ограничиваясь ими.

45 [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 25 путем замены Fc-спейсерной области в C123CAR на спейсер, не способный к Fc- 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 EC, или индекс EC по Kabat. Для всех позиций, обсуждаемых в данном документе, нумерация осуществляется в соответствии с индексом EC или схемой нумерации EC (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 EC, или индекс EC по Kabat, или схема нумерации EC, относится к нумерации антитела по EC (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 EC для данной позиции. Например, замены S228P и L235E, описанные выше, 40 относятся к позициям по EC. 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 45 костимуляторный домен, включая, но не ограничиваясь ими, костимуляторный домен 4-1BB, костимуляторный домен OX-40, костимуляторный домен CD27 или 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 5 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 10 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 15 523-524 из SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 13 (например, RLLH → RGHH [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 20 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 25 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 30 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

35 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

40 [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 микроранулами

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

5 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

10 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 15 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).

20 [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 плазмида. В некоторых воплощениях вектор представляет собой вирусный вектор, выбранный 25 среди ретровирусного вектора, лентивирусного вектора, поксвирусного вектора, аденоовирусного 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.

30 [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 35 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.

40 [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 45 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,

твёрдый или полутвёрдый наполнитель, растворитель, поверхностно-активный агент, разбавитель, эксципиент, адьювант, связующий агент, буфер, агент, способствующий растворению, растворитель, материал для инкапсулирования, секвестрант (изолирующий агент), диспергирующий агент, консервант, смазку, разрыхлитель, загуститель, 5 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, 10 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, 15 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 20 как масло какао и воски для суппозиториев; (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 25 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) термопласти, такие как полимолочная кислота, полигликолевая кислота, (22) полиэфиры, такие как поликапролактон; (23) самоорганизующиеся пептиды; и (24) 30 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 35 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 40 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 45

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 15 26292CAR (S228P+L235E+N297Q) (фиг. 13). Когда такие клетки вводят при адоптивной иммунотерапии, трансдуцированные Т-клетки специфически нацелены и лизируют 20 CD123-экспрессирующие клетки (например, AML-клетки) *in vivo*, тем самым обеспечивая их терапевтический эффект по устраниению 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", 25 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 как-либо терапии на данные *in vivo*. Иногда данные *in vitro* действительно совпадают с 30 данными *in vivo*. Тем не менее, эта корреляция является непредсказуемой, потому как 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 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, 35 отдельно или как часть фармацевтической композиции. Путь введения может относиться к любому пути введения, известному в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, внутричерепной, парентеральный или трансдермальный. "Парентеральный" относится к пути введения, который, как правило, связан с инъекцией, включая подглазничную, инфузию, внутриартериальную, внутрисуставную, внутрисердечную, 40 внутрикожную, внутримышечную, внутрибрюшинную, внутрилегочную, 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, 21st 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 5 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 10 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 15 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 20 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 25 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 30 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 35 ограничиваясь ими, полностью транс-ретиноевую кислоту (all-trans-retinoic acid, ATRA), триоксид мышьяка, антрациклические антибиотики и их фармацевтически приемлемые соли (например, доксорубицина гидрохлорид, даунорубицина гидрохлорид, идарубицин, митоксантрон), алкилирующие агенты (например, циклофосфамид, ларомустин), 40 антиметаболические аналоги (цитарabin, 6-тиогуанин, 6-меркаптопурин, метотрексат), деметилирующие агенты (например, децитабин, 5-азацитидин), ингибиторы синтеза нукleinовых кислот (например, гидроксимочевина), ингибиторы топоизомеразы 45 (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-антigen, включая, но не ограничиваясь ими, CD33 (например, гемтузумаб, линтузумаб),

5 MUC1 (например, кантузумаб равтанзин, кливатузумаб тетраксетан, пемтумомаб); (ii) В-клеточный антиген (например, ритуксимаб, офатумумаб); или сосудистый модулятор, такой как VEGF или VEGFR (например, алализумаб пегол, бевацизумаб, икрукумаб, рамуцирумаб, ранибизумаб).

[0077] Нацеленные терапевтические средства, которые могут быть введены в

10 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).

15 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 20 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 25 [19]. Клетки LCL-OKT3 экспрессируют мембранный OKT3 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 30 (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.

35 [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) ^a	CD123 % положит.
5	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), dic (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
10	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

^aИндекс относительной флуоресценции (RFI) представляет собой отношение медианы 5F5-меченного сигнала к изотипическому контрольному штамму в популяции CD34⁺

^bгейтированы по популяции CD34⁺

Н.о. – не определено

ПК – периферическая кровь

[0080] Проточная цитометрия. Конъюгированные с флуорохромом изотипические контроли, анти-CD4, анти-CD8, анти-T-клеточный рецептор αβ (TCRαβ), 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 293T с помощью CD123. кДНК CD123 амплифицировали из CD123-pMD18-T (Sino Biological Inc.) путем полимеразной цепной реакции с использованием праймеров (CD123-F: 5'-

ATAAGGCCTGCCGCCACCATGGTCCTCCTTGGCTCACG-3' и CD123-R 5'-

ATAGCTAGCTCAAGTTTCTGCACGACCTGTACTTC-3'). ПЦР-продукт клонировали в pMGPac с использованием сайтов рестрикции StuI и NheI. Клетки 293T 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 кодонам 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 293T лентивирусным вектором и упаковочными векторами pCMV-Rev2, pCHGP-2 и pCMV-G с помощью набора для трансфекции клеток млекопитающих CalPhosTM (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) (фиг. 11 и 13).

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

[0083] Трансдуция PBMC от здоровых доноров и пациентов с AML.

Неидентифицированные PBMC 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, дополненной 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⁺-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 сукцинимидовым эфиром карбоксифлуоресцеина (carboxyfluorescein succinimidyl ester CFSE; Molecular Probes) в соответствии с инструкциями производителя. Меченные Т-клетки культивировали совместно со стимуляторными клетками в соотношении E:T=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 ⁵¹Cr (PerkinElmer), промывали пять раз и аликовотировали в трех повторах с 5×10^3 клеток/лунка с эффекторными клетками в различных соотношениях эффектора к мишени (E:T). 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 E:T=10:1 измеряли, как описано ранее [25].

[0087] CD107a-дегрануляция и внутриклеточная продукция цитокинов. Т-клетки культивировали совместно с клетками-мишениями при E:T=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 пермеабилизовали (Cytofix/Cytoperm™ BD Biosciences) в соответствии с инструкциями производителя и метили анти-IFN-γ (BD

Biosciences, клон B27) и анти-TNF- α (BD Biosciences, клон MA11). 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 $^{+}$ -клетки из мононуклеарных клеток пуповинной крови (cord blood, CB) или первичных образцов AML были выбраны с помощью колонки для иммуномагнитного разделения (Miltenyi Biotech). 10 3 CD34 $^{+}$ -CB-клеток совместно культивировали с 25 \times 10 3 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 \times 10 3 CD34 $^{+}$ -AML-клеток совместно культивировали с 125 \times 10 3 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 ζ . 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 антибиотиновыми 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-клеточных 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⁺LCL, но не мишени CD19⁻KG1a или K562 (фиг. 2D). Ложно-трансдуцированные исходные клетки лизировали только положительный контроль, клеточную линию LCL-OKT3 (фиг. 2D).

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

[0092] Чтобы исследовать эффекторную функцию CD123-специфичных Т-клеток, измеряли секрецию IFN- γ и TNF- α с последующим совместным культивированием с различными опухолевыми клеточными линиями. Т-клеточные продукты, экспрессирующие CD123-CAR, продуцировали как IFN- γ , так и TNF- α при совместном 10 культивировании с CD123⁺-клетками-мишениями, в то время как парные CD19-специфические Т-клетки секретировали эти цитокины только при совместном

культивировании с клеточными линиями CD19⁺LCL или LCL-OKT3 (фиг. 3A). Кроме того, обе CD123-специфичные Т-клеточные линии пролиферировали при совместном 15 культивировании с любой из клеточных линий CD123⁺LCL, LCL-OKT3 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-OKT3 (фиг. 3B).

20 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).

25 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 30 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- γ и TNF- α с помощью полихроматической проточной цитометрии (стратегия гейтирования показана на фиг. 15). Мобилизация CD107a клеточной поверхности наблюдалась как в CD4-, так и в CD8- 35 компартментах CD123-специфичных Т-клеток, в то время как парные CD19R-T-клетки не показывали заметной дегрануляции против первичных образцов AML (фиг. 4A, столбчатые диаграммы). Кроме того, субпопуляции CD107a⁺CD123-CAR-T-клеток 40 также продуцировали либо IFN- γ , либо TNF- α , 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 45 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 наблюдалось в обеих популяциях CD4 и CD8 (фиг. 16). Парные CD19-специфические Т-клетки пролиферировали при совместном культивировании с CD19⁺ пре-B-ALL-802, но не при совместном культивировании с 45 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 (CB), обогащенных CD34, формировать колонии. Формирование миелоидных и эритроидных колоний образцами

5 CB 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-T-клетками (фиг. 6А и 6В). Далее исследовали способность CD123-

специфичных Т-клеток ингибировать рост первичных клоногенных клеток AML *in vitro*. Обе CD123-CAR-T-клеточные линии значительно уменьшали формирование

10 лейкемических колоний по сравнению с парными CD19R-T-клетками (фиг. 6С).

Примечательно, что CD123-специфичные Т-клетки имели большее влияние на формирование лейкемических колоний по сравнению с формированием нормальных миелоидных колоний (фиг. 6Д, снижение на 69% по сравнению со снижением на 31%, соответственно).

15 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 репополяризуют актин и образуют дефектные иммунные синапсы с аутологичными бластами [32]. Кроме того, насколько мы знаем, CAR-экспрессирующие Т клетки, полученные от пациентов 20 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 25 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

30 высвобождения ⁵¹Cr. В отличие от парных CD19R-T-клеток, обе CD123-CAR-T-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 35 цитотоксичности по сравнению с парными CD19R-CAR-T-клетками (5В).

[0096] (Эффективность трансдукции 23-37%). Характерный пример фенотипа CAR-T-клеток, полученных от пациентов с AML, показан на фиг. 7А. Далее проверяли цитолитический потенциал CAR-T-клеток, полученных от пациентов с AML, против 40 аутологичных CD34-обогащенных клеток-мишеней, в 4-часовом анализе высвобождения

⁵¹Cr. Все аутологичные CD34-обогащенные клетки экспрессировали CD123, хотя с различным процентном 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 иммунотоксина (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

5 высвобождения хрома-51 (^{51}Cr), Т-клетки здорового донора, которые были

6 спроектированы для экспрессии CD123 CAR, эффективно лизировали CD123 $^{+}$ -клеточные линии и первичные образцы от пациентов с AML. Кроме того, обе CD123-CAR-T-

7 клеточные линии активировали множественные эффекторные функции после

8 совместного культивирования с клеточными линиями CD123 $^{+}$ и первичными образцами

9 от пациентов с AML. Кроме того, CD123-нацеленные Т-клетки существенно не

10 уменьшали число гранулоцитарно-макрофагальных колониев образующих единиц (CFU-GM)

11 и эритроидных единиц, образующих "взрывообразные" колонии (BFU-E) из

12 пуповинной крови (CB) по сравнению с CD19-CAR-T-клетками. Примечательно, что в

13 то время как CD19-специфические Т-клетки оказали небольшое влияние на

14 формирование лейкемических колоний первичных образцов AML, CD123-нацеленные

15 Т-клетки значительно снижали формирование лейкемических колоний *in vitro*. Было

16 также показано, что Т-клетки, полученные от пациентов с AML, могут экспрессировать

17 CD123 CAR и лизировать аутологичные бласты *in vitro*.

[0098] Т клетки, экспрессирующие любой из двух CD123-специфичных CAR, могут

20 специфически лизировать CD123-экспрессирующие клеточные линии и первичные

21 образцы от пациентов с AML и активировать множественные эффекторные функции

22 антигенспецифическим образом *in vitro*, показывая, что оба эпитопа являются

23 потенциальными мишениями для лечения. Между CD123-CAR-инженерными Т-

24 клеточными линиями не наблюдалось никаких серьезных различий в отношении

25 уничтожения целевых клеток, секреции цитокинов или пролиферации при совместном

26 культивировании с CD123 $^{+}$ -клетками. Одно из возможных объяснений этого заключается

27 в том, что связывающие аффинности CD123-специфичных scFv, используемых в CD123-

28 CAR, находятся в наномолярном диапазоне и отличаются менее чем в 3 раза и,

29 следовательно, scFv не дают никакого существенного преимущества в связывании

30 целевого антигена [18].

[0099] Экспрессия множества антигенов клеточной поверхности на клетках AML

31 была хорошо задокументирована [4, 27, 34]. Ориентация некоторых из этих антигенов

32 на CAR-экспрессирующие Т-клетки может быть невозможной. Например, AML-

33 ассоциированный антиген TIM-3 экспрессируется на подгруппе истощенных Т-клеток

34 [35, 36] и нацеливание на TIM-3 с помощью CAR-инженерных Т-клеток может привести

35 к аутолизу генетически модифицированных клеток. Кроме того, CD47 экспрессируется

36 повсеместно [37] и, таким образом, вряд ли может быть мишенью CAR-инженерных

37 Т-клеток. Антиген дифференциации CD33 преимущественно экспрессируется на

38 миелоидных клетках, и иммунотерапевтические средства, нацеленные на CD33, такие

39 как гемтузумаб озогамицин, антитела, связывающие CD33/CD3-биспецифические Т-

40 клетки, и CD33 CAR в настоящее время используются в клинических и доклинических

41 условиях [17, 38, 39]. Как и TIM-3, CD33 экспрессируется на подгруппе Т-клеток, что

42 делает его неидеальной мишенью для терапии, основанной на CAR [40]. Кроме того,

43 антилейкемическая активность CD33-нацеливающих терапевтических средств часто

44 сопровождается медленным восстановлением кроветворения и цитопении, вероятно,

45 в результате экспрессии CD33 на долгоживущих самообновляющихся нормальных

46 гемопоэтических стволовых клетках (hematopoietic stem cell, HSC) [41]. Кроме того,

47 гепатотоксичность является распространенным побочным эффектом CD33-нацеленного

лечения и, возможно, является результатом непреднамеренного нацеливания на CD33⁺ 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⁺ клеточных линий и первичных образцов AML. Исследования, описанные ниже, показывают, что первичные образцы от пациентов с высоким риском AML, были чувствительны к 15 цитотоксичности, опосредованной CD123-CAR-T-клетками. В совокупности, в 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⁺. 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-T-клеточном 25 ответе [44]. Действительно, пациенты, реагирующие на CD19-CAR-T-клеточную терапию, имеют обнаруживаемые Т-клеточные ответы (т.е. дегрануляцию, секреция цитокинов или пролиферацию) после терапии в ответ на CD19⁺ мишени *ex vivo* [11, 12, 14]. В приведенных ниже примерах была показана функциональность CD123-CAR-30 экспрессирующих Т-клеток путем анализа повышающей регуляции CD107a, продукции цитокинов и пролиферации CD123-специфичных Т-клеток в ответ на обе CD123⁺ клеточные линии и первичные AML-образцы. Кроме того, многофункциональность наблюдалось в обоих компартментах, как CD4⁺, так и CD8⁺, 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 E:T=25:1. Экспрессия CD123 на клетках род⁻CD34⁺CD38⁻ является отличительной чертой общей миелоидной клетки-предшественника и, таким образом, вероятно, является мишенью CD123-CAR-T-клеток [31]. В то время как при инкубации СВ-клеток с CD123-специфичными Т-клетками 45 наблюдалось уменьшение относительного процента колоний миелоидного происхождения, снижение было не значительно меньше, чем у парных CD19R-CAR-T-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-T-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, 5 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 10 низкая относительная экспрессия CD123 на СВ-клетках по сравнению с AML-клетками частично может быть результатом неспособности CD123-CAR-T-клеток изменять 15 формирование колоний миелоидного происхождения *in vitro*. Хотя другие показали, что CD123 экспрессируется только в небольшой части род⁻CD34⁺CD38⁻ HSC, а два клинических испытания в I фазе с использованием агентов, нацеленных на CD123, не 20 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 аблляции CAR-экспрессирующих Т-клеток. Другие стратегии для модуляции CAR-T-клеточной активности, такие как 25 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 РВМС от пациентов с активным AML, могут быть генетически модифицированы для экспрессии CD123-CAR 25 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⁺LCL и KG1a 30 (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 35 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⁺ и CD123⁻ 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 40 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 45 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 водили $5,0 \times 10^6$ CAR⁺-T-клеток, экспрессирующих либо 26292CAR(S228P+L235E), либо 26292CAR(S228P+L235E+N297Q), и контролировали лейкемическую прогрессию путем биолюминесцентной визуализации. Как показано на фиг. 8, у мышей, получавших T-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 T-клетки, трансдуцированные 26292CAR(S228P+L235E+N297Q),
10 продемонстрировали уменьшение размера опухолей по сравнению с днем введения, подтверждая, что добавление мутации в шарнирную область в позиции 297 (N297Q)
15 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 Bcell 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.

5 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.

10 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.

15 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 mmortalization by Epstein-Barr virus in the presence of cyclosporin A. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1986. 22(12): p. 689-94.

20 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.

25 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.

30 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 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.

35 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.

40 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.

5 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.

10 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.

15 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.

20 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.

25 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.

30 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.

35 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 40 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

45 1. Молекула нукleinовой 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_L и V_H рекомбинантного иммунотоксина 26292 или домен V_L и V_H 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 трансдудированы 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
 MARDIROS, 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 ctgggtgcaga gcggcccgga actgaaaaaa 120
 ccgggcgaaa ccgtgaaaat tagctgcaaa gcgagcggct atatttttac caactatggc 180
 atgaactggg taaaaacaggc gccgggcaaa agctttaaat ggatgggctg gattaacacc 240
 tataccggcg aaagcaccta tagcgcggat tttaaaggcc gcttgcgtt tagcctggaa 300
 accagcgcga gcaccgcgtt tctgcattt aacgatctga aaaacgaaga taccgcgacc 360
 tattttgcg cgcgcagcgg cggctatgtat ccgatggatt attggggcca gggcaccagc 420
 gtgaccgtga gcagcggcgg cggcggcagc ggcggcggcg gcagcggcgg cggcggcagc 480
 gatattgtgc tgacccagag cccggcgagc ctggcggtga gcctgggcca ggcgcgcacc 540
 attagctgcc gcgcgagcga aagcgtggat aactatggca acacctttat gcattggtat 600
 cagcagaaac cggggcagcc gccgaaactg ctgatattatc gcgcgagcaa cctggaaagc 660
 ggcattccgg cgcgttttag cggcagcggc agccgcaccg atttaccct gaccattaac 720
 cccgttggaaag cggatgtatgt ggcgcacctat tattggcagc agagcaacga agatccgccc 780
 acctttggcg cgggcaccaa actggaaactg aaagagagca agtacggccc tccctgcccc 840
 ccttgcctcg ccccccggat cggcggcggc cccagcgtgt tcctgttccc ccccaagccc 900
 aaggacaccc tggatgtatcag cccgacccccc gaggtgacct gcgtgggtgtt ggacgtgagc 960
 caggaagatc ccgaggtcca gttcaattgg tacgtggacgc gcgtggaaagt gcacaacgcc 1020
 aagaccaagc ccagagagga acagttcaac agcacctacc gggtggtgtc tgtgtgacc 1080

gtgctgcacc	aggactggct	gaacggcaaa	gaataacaagt	gcaaggtgtc	caacaaggc	1140
ctgcccagca	gcatcgaaaa	gaccatcagc	aaggccaagg	gccagcctcg	cgagccccag	1200
gtgtacaccc	tgccctccctc	ccaggaagag	atgaccaaga	accaggtgtc	cctgacactgc	1260
ctggtaagg	gcttctaccc	cagcgacatc	gccgtggagt	gggagagcaa	cggccagcct	1320
gagaacaact	acaagaccac	ccctcccggt	ctggacagcg	acggcagctt	cttcctgtac	1380
agccggctga	ccgtggacaa	gagccgggtgg	caggaaggca	acgtctttag	ctgcagcgtg	1440
atgcacgagg	ccctgcacaa	ccactacacc	cagaagagcc	tgacgcgtc	cctgggcaag	1500
atgttctggg	tgctgggtgg	ggtggggcggg	gtgctggcct	gctacagcct	gctgggtgaca	1560
gtggccttca	tcatcttttgc	gggtgcggagc	aagcggagca	gaggcggcca	cagcgactac	1620
atgaacatga	ccccagacg	gcctggcccc	acccggaaagc	actaccagcc	ctacgccccca	1680
cccaggact	ttgccgccta	ccgggtccggc	ggaggggcggg	tgaagttcag	cagaagcgcc	1740
gacgccccctg	cctaccagca	gggccagaat	cagctgtaca	acgagctgaa	cctggcaga	1800
agggaaagagt	acgacgtcct	ggataagcgg	agaggccggg	accctgagat	gggcggcaag	1860
cctcggcgg	agaaccccca	ggaaggcctg	tataacgaac	tgcagaaaga	caagatggcc	1920
gaggcctaca	gcgagatcgg	catgaagggc	gagcggaggc	ggggcaaggg	ccacgacggc	1980
ctgtatcagg	gcctgtccac	cgccaccaag	gatacctacg	acgcccgtca	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

gctagcggc	ccaccatgt	gctgctggtg	accagcctgc	tgctgtgcga	gctgccccac	60
ccgcctttc	tgctgatccc	ccaggtgcag	ctgcagcagc	cggggcggga	actgggtgcgc	120
ccgggcgcga	gcgtgaaact	gagctgcaaa	gcgagcggct	atacccttac	cagctattgg	180
atgaactggg	tgaaacagcg	cccgatcg	ggcctggaaat	ggattggccg	cattgatccg	240
tatgatagcg	aaacccatta	taaccagaaa	ttaaaagata	aagcgattct	gaccgtggat	300
aaaagcagca	gcaccgcgt	tatgcagctg	agcagcctga	ccagcgaaga	tagcgcggtg	360
tattattgcg	cgcgcggcaa	ctgggatgat	tattggggcc	agggcaccac	cctgaccgtg	420
agcagcggcg	gcggcggcag	cggcggcggc	ggcagcggcg	gcggcggcag	cgatgtgcag	480
attaccaga	gccccgagcta	tctggcggcg	agccggggcg	aaaccattac	cattaactgc	540
cgcgcgagca	aaagcattag	caaagatctg	gcgtggatc	aggaaaaacc	gggcaaaacc	600

Page 2

aacaaactgc tgatttatag cgccagcacc ctgcagagcg gcattccgag ccgccttagc	660
ggcagcggca gcggcaccga tttaccctg accattagca gcctggaacc ggaagattt	720
gcgtgttatt attgccagca gcataacaaa tatccgtata ccttggcgg cggcaccaaa	780
ctggaaatta aagagagcaa gtacggccct ccctgcccc cttgcccgc ccccgagttc	840
gagggcggac ccagcgtgtt cctgttcccc cccaaagccca aggacaccct gatgatcagc	900
cggacccccc aggtgacctg cgtgggtgtg gacgtgagcc aggaagatcc cgaggtccag	960
ttcaatttgtt acgtggacgg cgtggaaagtg cacaacgcca agaccaagcc cagagaggaa	1020
cagttcaaca gcacacctcc ggtgggtgtct gtgctgaccg tgctgacca ggactggctg	1080
aacggcaaag aatacaagtg caaggtgtcc aacaaggggcc tgcccagcag catcgaaaag	1140
accatcagca aggccaaggg ccagcctcgc gagccccagg tgtacaccct gcctccctcc	1200
caggaagaga tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgccc tggtaaggg cttctacccc	1260
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagcctg agaacaacta caagaccacc	1320
cctccctgc tggacagcga cggcagcttc ttccctgtaca gcccgtgac cgtggacaag	1380
agccggtggc aggaaggcaa cgtcttttagc tgcaagcgtga tgcacgaggc cctgcacaac	1440
cactacaccc agaagagcct gagcctgtcc ctgggcaaga tggctgggt gctgggtgt	1500
gtgggcgggg tgctggcctg ctacagcctg ctggtgacag tggccttcat catctttgg	1560
gtgcggagca agcggagcag aggcggccac agcgaactaca tgaacatgac cccagacgg	1620
cctggcccca cccggaagca ctaccagccc tacgccccac ccaggactt tgccgcctac	1680
cggtccggcg gagggcggtt gaagttcagc agaagcggcc acgccccctgc ctaccagcag	1740
ggccagaatac agctgtacaa cgagctgaac ctgggcagaa gggaaagatgta cgacgtcctg	1800
gataagcggc gaggccggga ccctgagatg ggcggcaagc ctcggcgaa gaaccccccag	1860
gaaggcctgt ataacgaact gcagaaagac aagatggccg aggctacag cgagatcggc	1920
atgaagggcg agcggaggcg gggcaagggc cacgacggcc tgtatcaggg cctgtccacc	1980
gccaccaagg atacctacga cgcctgcac 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
 gctagcggccg ccaccatgct gctgctggtg accagcctgc tgctgtgcga gctgccccac 60
 cccgccttcc tgctgatccc ccagattcag ctggtgacaga gcggcccgaa actgaaaaaa 120

ccgggcgaaa ccgtaaaaat tagctgaaaa gcgagcggct atattttac caactatggc	180
atgaactggg taaaaacaggc gccgggcaaa agctttaaat ggatgggctg gattaacacc	240
tataccggcg aaagcaccta tagcgcggat tttaaaggcc gcttgcgtt tagcctggaa	300
accagcgcga gcaccgcgtt tctgcattt aacgatctga aaaacgaaga taccgcgacc	360
tattttgcg cgccgcagcgg cggctatgtat ccgatggatt attggggcca gggcaccagc	420
gtgaccgtga gcagcggcgg cggcggcagc ggcggcggcg gcagcggcgg cggcggcagc	480
gatattgtgc tgacccagag cccggcggc ctggcgggtga gcctgggcca gcgcgcgacc	540
attagctgcc gcgcgagcga aagcgtggat aactatggca acaccttat gcattggtat	600
cagcagaaac cggccagcc gccgaaactg ctgatttacgc gcgcgagcaa cctggaaagc	660
ggcattccgg cgccgtttag cggcagcggc agccgcaccg atttaccctt gaccattaaac	720
ccgggttggaaag cggatgtatgtt ggcgcacccat tattgcccggc agagcaacga agatccgcgg	780
acctttggcg cgggcaccaa actggaaactg aaagagagca agtacggccc tccctgcccc	840
ccttgcctg ccccgagtt cgagggcggc cccagcgtgt tcctgttccc ccccaagccc	900
aaggacaccc ttagtgcacgg cccggacccccc gaggtgaccc tcgtgggtgtt ggacgtgagc	960
caggaagatc ccgaggtcca gttcaattgg tacgtggacg gcgtggaaagt gcacaacgc	1020
aagaccaaggc ccagagagga acagttccar agcacctacc gggtgggtgc tgcgtgc	1080
gtgcgtcacc aggactggctt gaacggcaaa gaataacaagt gcaagggtgtc caacaaggc	1140
ctgcccagca gcatcgaaaaa gaccatcagc aaggccaagg gccagcctcg cgagccccag	1200
gtgtacaccc tgcctccctc ccaggaagag atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgc	1260
ctgggtgaagg gcttctaccc cagcgcacatc gccgtggagt gggagagcaa cggccagcct	1320
gagaacaact acaagaccac ccctccctg ctggcagcgc acggcagctt ctccctgtac	1380
agccggctga ccgtggacaa gagccgggtgg caggaaggca acgtctttag ctgcagcgtg	1440
atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc cagaagagcc tgagcctgtc cctgggcaag	1500
atgttctggg tgctgggtgtt ggtggggcggg gtgcgtggct gctacagcct gctgggtgaca	1560
gtggccctca tcatcttttgg tgcggcggc aagcggagca gaggccggca cagcgcactac	1620
atgaacatga ccccgagacg gcctggcccc acccggaaagc actaccagcc ctacgcccc	1680
cccaaggact ttgcgccta ccggcggc ggagggcggg tgaagttcag cagaagcgc	1740
gacgccccctg cttaccagca gggccagaat cagctgtaca acgagctgaa cctgggcaaga	1800
agggaaagagt acgacgtcct ggataagcgg agaggccggg accctgagat gggcggcaag	1860
cctcggcggaa agaaccggcca ggaaggcctg tataacgaac tgcagaaaga caagatggcc	1920
gaggcctaca gcgagatcgg catgaaggc gagcggaggc gggcaaggg ccacgcggc	1980
ctgtatcagg gcctgtccac cgccaccaag gatacctacg acgcccgtca catgcaggcc	2040

ctgcccccaa gg	2052
<210> 4	
<211> 2031	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> antisense nucleotide sequence of the 26292CAR(S228P+L235E+N297Q) construct	
<400> 4	
gctagcgccg ccaccatgct gctgctggtg accagcctgc tgctgtgcga gctgccccac	60
cccgcccttc tgctgatccc ccagggcagc ctgcgcgcgc cggggcggga actgggtgcgc	120
ccggggcgcga gcgtgaaact gagctgcaaa gcgcgcgcgc ataccttac cagctattgg	180
atgaactggg tgaaacagcg cccggatcg ggcctggaaat ggattggccg cattgatccg	240
tatgatagcg aaaccattta taaccagaaa tttaaagata aagcgattct gaccgtggat	300
aaaagcagca gcaccgcgta tatgcagctg agcagcctga ccagcgaaga tagcgcggtg	360
tattattgcg cgccgcgcaaa ctggatgat tattttggcc agggcaccac cctgaccgtg	420
agcagcggcg gcggcggcag cggcggcggc ggcagcggcg gcggcggcag cgatgtgcag	480
attaccaga gcccggacta tctggcggcg agccggggcg aaaccattac cattaactgc	540
cgcgcgagca aaagcattag caaagatctg gcgtggatc aggaaaaacc gggcaaaacc	600
aacaaactgc tgattttatag cggcagcacc ctgcagagcg gcattccgag ccgtttagc	660
ggcagcggca gcggcaccga ttttaccctg accattagca gcctggaaacc ggaagattt	720
gcgtgtatt attgccagca gcataacaaa tatccgtata ctttggcgg cggcaccaaa	780
ctggaaatta aagagagcaa gtacggccct cccctggggcc cttggccctgc ccccgagttc	840
gagggcggac ccagcgtgtt cctgttcccc cccaaagccca aggacaccct gatgatcagc	900
cggacccccc aggtgacccgt cgtgggtgt gacgtgagcc aggaagatcc cgaggtccag	960
ttcaatttgtt acgtggacgg cgtggaaatg cacaacgcca agaccaagcc cagagaggaa	1020
cagttcaara gcacctaccg ggtgggtct tgcgtgaccc tgctgcacca ggactggctg	1080
aacggcaaag aatacaagtg caaggtgtcc aacaagggcc tgcccagcag catcgaaaag	1140
accatcagca aggccaaggg ccagcctcgc gagcccccagg tgtacaccct gcctccctcc	1200
caggaagaga tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgccc tggtaaggg cttctacccc	1260
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagccctg agaacaacta caagaccacc	1320
cctccctgtgc tggacagcga cggcagcttc ttccctgtaca gcccggctgac cgtggacaag	1380
agccgggtggc aggaaggcaa cgtcttttagc tgcagcgtga tgcacgaggc cctgcacaac	1440
cactacaccc agaagagcct gaggcgttcc ctggggcaaga tggctgggt gctgggtgg	1500
gtggggcgggg tgctggcctg ctacagcctg ctgggtgacag tggccctcat catctttgg	1560

Page 5

gtgcggagca	agcggagcag	aggcggccac	agcgactaca	tgaacatgac	ccccagacgg	1620
cctggcccca	cccggaagca	ctaccagccc	tacgccccac	ccagggactt	tgccgcctac	1680
cggtccggcg	gagggcgggt	gaagttcagc	agaagcgccg	acgcccctgc	ctaccagcag	1740
ggccagaatc	agctgtacaa	cgagctgaac	ctgggcagaa	ggaaagagta	cgacgtcctg	1800
gataagcgg	gaggccggga	ccctgagatg	ggcggcaagc	ctcggcgaa	gaacccccag	1860
gaaggcctgt	ataacgaact	gcagaaaagac	aagatggccg	aggcctacag	cgagatcggc	1920
atgaaggcgc	agcggaggcg	gggcaagggc	cacgacggcc	tgtatcaggg	cctgtccacc	1980
gccaccaagg	atacctacga	cgccctgcac	atgcaggccc	tgccccc	aaag	2031
<210>	5					
<211>	2052					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220>						
<223>	sense nucleotide sequence of the 32716CAR(S228P+L235E) construct					
<400>	5					
cgatcgcggc	ggtgttacga	cgacgaccac	tggtcggacg	acgacacgct	cgacgggtg	60
gggcggaaag	acgactatggg	ggtctaagtc	gaccacgtct	cgccgggcct	tgacttttt	120
ggcccgcttt	ggcactttta	atcgacgttt	cgctcgccga	tataaaaatg	tttgataccg	180
tacttgaccc	actttgtccg	cgggccgttt	tcgaaattta	cctacccgac	ctaattgtgg	240
atatggccgc	tttcgtggat	atcgcgccta	aaatttccgg	cgaaacgc当地	atcgaccc	300
tggtcgcgt	cgtggcgcat	agacgtataa	ttgctagact	ttttgttct	atggcgctgg	360
ataaaaacgc	gcmcgtcgcc	gccgatacta	ggctaccta	taaccccggt	cccggttgc当地	420
cactggcact	cgtcgccgccc	gccgcccgtcg	ccgcccgc当地	cgctcgccgc当地	ccgcgcgtcg当地	480
ctataacacg	actgggtctc	gggcccgtcg	gaccgc当地	cgaccccggt	cgmcgtcgctgg当地	540
taatcgacgg	cgcgctcgct	ttcgcaccta	ttgataccgt	tgtggaaata	cgtaaccata当地	600
gtcgcttttgc	gccccgtcg	cggtttgac	gactaaatag	cgcgctcgct	ggaccc	660
ccgtaaggcc	gcmcgtcgcc	gccgatcgcc	tcggcgatggc	taaaatggg	ctggtaattg当地	720
ggccaccc	gccccgtcg	ccgatcgcc	tcggcgatggc当地	taaaatggg	ctggtaattg当地	780
tggaaaccgc	gccccgtcg	tgacccttgc	tttctctcg	tcatgcccgg	agggacgggg当地	840
ggaacgggac	ggggggctcaa	gctcccgcc	gggtcgacaca	aggacaaggg	gggggttgc当地	900
ttcctgtggg	actactagtc	ggcctgggg	ctccactgga	cgaccc	ccctgcactcg当地	960
gtccttctag	ggctccaggt	caagttaacc	atgcacctgc	cgaccc	ttca	1020
ttctgtgg	ggctctccct	tgtcaagttg	tcgtggatgg	cccaccacag	acacgactgg当地	1080
cacgacgtgg	tcctgaccga	cttgcgttt	cttatgttca	cggttccacag	gttgttcccg当地	1140

gacgggtcgt cgtagtttt ctggtagtcg ttccggttcc cggtcggagc gctcggggtc	1200
cacatgtggg acggagggag ggtccttctc tactggttct tggtccacag ggactggacg	1260
gaccacttcc cgaagatggg gtcgtgttag cgccacaccta ccctctcggt gccggtcgga	1320
ctcttggta tggtctggtg gggagggcac gacctgtcgc tgccgtcgaa gaaggacatg	1380
tcggccgact ggcacctgtt ctcggccacc gtcctccgt tgcagaaatc gacgtcgac	1440
tacgtgctcc gggacgtgtt ggtgtatgtgg gtcttctcggt actcggacag ggacccgttc	1500
tacaagaccc acgaccacca ccaccggccc cacgaccggaa cgatgtcgga cgaccactgt	1560
caccggaaagt agtagaaaaac ccacgcctcg ttgcgcctgt ctccgcccgt gtcgctgatg	1620
tacttgtact ggggggtctgc cggaccgggg tggggccttcg tgatggtcgg gatgcgggggt	1680
gggtccctga aacggcggat ggccaggccg cctcccgcccc acttcaagtc gtcttcgcccgg	1740
ctgcggggac ggtatggtcgt cccggctta gtcgacatgt tgctcgactt ggacccgttc	1800
tcccttctca tgctgcagga cctattcgcc tctccggccc tggggactctaa cccgcccgttc	1860
ggagccgcct tcttgggggt ccttccggac atattgcttgc acgtctttct gttctaccgg	1920
ctccggatgt cgctctagcc gtacttcccg ctgcgcctccg ccccggtcccc ggtgctgcgc	1980
gacatagttcc cggacaggtg gcgggtggttc ctatggatgc tgccggacgt gtacgtccgg	2040
gacgggggggtt cc	2052

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

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

```

<400> 6
cgatcgccgc ggtggatcga cgacgaccac tggtcggacg acgacacgct cgacggggtg 60
ggccggaaag acgactaggg ggtccacgta gacgtcgctg gccccgcgcct tgaccacgct 120
ggcccgccgt cgcaclttga ctgcacgttt cgctcgccga tatggaaatg gtcgataacc 180
tacttgaccc actttgtcgc gggccatgtc ccggaccctta cctaaaccggc gtaactaggg 240
atactatcgc tttgggtaat attggcttt aaatttctat ttcgctaaga ctggcaccta 300
tttcgtcggt cgtggcgcat atacgtcgac tcgtcgact ggtcgcttct atcgccac 360
ataataaacgc ggcgcgcgtt gaccctacta ataaccggg tcccggtgtg ggactggcac 420
tcgtcgccgc cgccgcgcgc gccgcgcgc ccgtcgccgc cgccgcgcgc gctacacgct 480
taatgggtct cgggctcgat agaccgcgc tcggggccgc ttggtaatg gtaattgacg 540
gcgcgcgtt tttcgtaatc gtttctagac cgacccatag tccttttgg cccgtttgg 600
ttgtttgacg actaaatatc gccgtcggtt gacgtctcgac cgtaaggctc ggcgaaatcg 660

```

ccgtcgccgt	cgccgtggct	aaaatgggac	tggtaatcg	cgacgctgg	cttctaaaa	720
cgctacataa	taacggtcgt	cgtattgtt	ataggcatat	ggaaaccgcc	ggcgtggtt	780
gacccttaat	ttctctcggt	catgccggg	gggacgggg	gaacgggacg	ggggctcaag	840
ctcccgccctg	ggtcgcacaa	ggacaagggg	gggttcgggt	tcctgtggga	ctactagtcg	900
gcctggggc	tccactggac	gcaccaccac	ctgcactcg	tccttctagg	gctccaggtc	960
aagttAACCA	tgacacctgcc	gcacccac	gtgttgcgt	tctggttcg	gtctccctt	1020
gtcaagttgt	cgtggatggc	ccaccacaga	cacgactggc	acgacgtgtt	ctgaccgac	1080
ttgcccgg	ttatgttcac	gttccacagg	ttgttccgg	acgggtcg	gtagctttc	1140
tggtagtcgt	tccgggtccc	ggtcggagc	ctcggttcc	acatgtgg	cgagggagg	1200
gtccttcct	actgggttctt	ggtccacagg	gactggacgg	accacttccc	gaagatgggg	1260
tcgctgttagc	ggcacccac	cctctcggt	ccggcggac	tcttgttgc	gttctgggt	1320
ggagggc	acctgtcg	ggcgcaag	aaggacatgt	cgccgcact	gcacccgttc	1380
tcggccacc	tccttcgtt	gcagaaatcg	acgtcgact	acgtgttcc	ggacgtgtt	1440
gtgatgtgg	tcttcgtt	ctcggacagg	gaccgttct	acaagacca	cgaccaccac	1500
cacccccc	acgacccgg	gatgtcg	gaccactgt	accggaa	gtaaaaacc	1560
cacgcctcg	tcgcctcg	tccgggtt	tcgctgtat	acttgtact	ggggctcg	1620
ggacgggg	gggccttcgt	gatgtcg	atgggggt	ggtccctgaa	acggcggat	1680
gccaggccgc	ctcccgccca	cttcaagt	tcttcgttgc	tgcgggac	gatgtcg	1740
ccggctttag	tcgacatgtt	gctcgactt	gaccgttct	cccttctcat	gctcgaggac	1800
ctattcgct	ctccggccct	gggactctac	ccggcgttgc	gagccgc	ttgggggtc	1860
cttccggaca	tattgttga	cgtttctg	ttctaccgg	tccggatgc	gctctagcc	1920
tacttccgc	tcgcctccgc	cccggttcc	gtgctgccc	acatgtccc	ggacaggtgg	1980
cggtggttcc	tatggatg	gcgggacgt	tacgtccgg	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	cgatcgccgc	gggtggtacga	cgacgaccac	tggtcggac	acgacacgct	cgacgggg	60
	gggcggaaag	acgactaggg	ggtctaagt	gaccacgtct	cgccgggc	ttgacttttt	120
	ggcccgctt	ggcactttta	atcgacgtt	cgctcgccg	tataaaaaatg	gttgataccg	180

tacttgaccc	actttgtccg	cggcccgtt	tcgaaaattt	cctacccgac	ctaattgtgg	240
atatggccgc	tttcgtggat	atcgcgcc	taaaattccgg	cgaaaacgca	atcgaccc	300
tggtcgcgct	cgtggcgcat	agacgtataa	ttgctagact	ttttgcttct	atggcgctgg	360
ataaaaaacgc	gcccgtcgcc	gcccatacta	ggctaccta	taaccccggt	cccggtcg	420
cactggcact	cgtcggcc	gcccgtcg	ccgccc	cgtcggcc	gcccgtcg	480
ctataacacg	actgggtctc	gggcccgtcg	gaccgccc	cggacccgg	cgtcgtcg	540
taatcgacgg	cgcgtcgct	ttcgcaccta	ttgataccgt	tgtggaaata	cgttaaccata	600
gtcgctttg	gcccgtcg	cggtttgac	gactaaatag	cgcgtcg	ggacc	660
ccgttaaggcc	gcccgtcg	tcggcgtggc	taaaaatggg	ctggtaattt	720	
ggccaccc	gcctactaca	ccgctggata	ataacgg	tctcg	tctaggcggc	780
tggaaaccgc	gcccgtgg	tgaccc	tttctctcg	tcatgcccgg	agggacgggg	840
ggaacgggac	gggggctcaa	gctccc	gggtcgcaca	aggacaagg	gggggtcggg	900
ttcctgtggg	actactagtc	ggcctgggg	ctccactgg	cgcaccacca	cctgcactcg	960
gtccttctag	ggctccaggt	caagttaacc	atgcac	cgcac	cgtgtcg	1020
ttctggttcg	ggtctctc	tgtcaagg	tcgtggatgg	cccacc	acacgactgg	1080
cacgacgtgg	tcctgaccga	cttgcgtt	cttatgtca	cgttcc	gttgc	1140
gacgggtcgt	cgtagcttt	ctggtagtgc	ttccgg	cggtcgg	gctcgg	1200
cacatgtggg	acggagg	ggtc	tactgg	ttgtcc	ggactgg	1260
gaccac	cgaagatggg	gtcg	tcgt	ccacc	acag	1320
ctcttgc	ttgttgc	gggg	ggc	ttcc	gtcg	1380
tcggcc	ggcac	ctcg	ttcg	ttcg	gacgtcg	1440
tacgtgc	gggacgtgtt	gg	gtgt	ttct	tcgg	1500
tacaagaccc	acgaccacca	ccac	ccac	ttcg	acag	1560
caccg	aaat	ccac	ccac	ttcg	ttcg	1620
tacttgc	gggg	ccac	ttcg	ttcg	ttcg	1680
gggtcc	ttgttgc	gggg	ttcg	ttcg	ttcg	1740
ctgcgg	ggatgg	cccg	ttcg	ttcg	ttcg	1800
tcccttc	ttgtc	ttcg	ttcg	ttcg	ttcg	1860
ggagcc	tttt	ttcg	ttcg	ttcg	ttcg	1920
ctccgg	ttgttgc	ttcg	ttcg	ttcg	ttcg	1980
gacatag	ttgttgc	ttcg	ttcg	ttcg	ttcg	2040
gacgggg	tttt	ttcg	ttcg	ttcg	ttcg	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 ggtggcacga cgacgaccac tggtcggacg acgacacgct cgacgggtg	60
gggcggaaag acgactaggg ggtccacgtc gacgtcgctg gccccgcct tgaccacgcg	120
ggcccgcgct cgcactttga ctcgacgtt cgctcgccga tatggaaatg gtcgataacc	180
tacttgaccc actttgtcgc gggcctagtc ccggaccta cctaaccggc gtaacttaggc	240
atactatcgc tttgggtaat attggcttt aaatttctat ttgcctaaga ctggcaccta	300
ttttcgctgt cgtggcgcat atacgtcgac tcgtcgact ggtcgcttct atcgcgccac	360
ataataacgc gcgcgcgcgtt gaccctacta ataaccccg tcccggttg ggactggcac	420
tcgtcgccgc cgccgcgcgc gccgcgcgc ccgtcgccgc cgccgcgcgc gctacacgtc	480
taatgggtct cgggctcgat agaccgcgc tcgggcccgc tttggtaatg gtaattgacg	540
gcgcgcgttgcgt tttcgtaatc gtttctagac cgcaccatag tccttttgg cccgttttg	600
ttgtttgacg actaaatatac gccgtcggtt gacgtctcgcc cgtaaggctc ggcaaatcg	660
ccgtcgccgt cgccgtggct aaaatggac tggtaatcg tggaccttgg ctttctaaaa	720
cgctacataa taacggtcgt cgtattttt ataggcatat gaaaccgc gccgtggttt	780
gaccttaat ttctctcggtt catgcccggaa gggacggggaa gaacgggacg ggggctcaag	840
ctccgcctg ggtgcacaa ggacaagggg gggttcggtt tcctgtggaa ctactagtcg	900
gcctggggc tccactggac gcaccaccac ctgcactcg tccttctagg gtcagggtc	960
aagttaacca tgcacctgcc gcacccacgt gtgttgcgtt tctgggttgcgt gtctccctt	1020
gtcaagttt cgtggatggc ccaccacaga cacgactggc acgacgttgtt cctgaccgac	1080
ttggcgtttc ttatgttac gttccacagg ttgttccgg acgggtcgctc gtagctttc	1140
tggtagtcgt tccgggtccc ggtcgagcg ctgggggtcc acatgtggaa cggaggagg	1200
gtccttcctt actgggttctt ggtccacagg gactggacgg accacttccc gaagatgggg	1260
tcgctgttagc ggcacccac cctctcggtt ccggtcggac tcttggatgt gttctgggtgg	1320
ggagggcaccg acctgtcgct gccgtcgaag aaggacatgt cggccactg gcacccgttc	1380
tcggccaccg tccttccgtt gcagaaatcg acgtcgact acgtgctccg ggacgtgttg	1440
gtgatgtggg tcttctcggtt ctcggacagg gacccgttctt acaagaccca cgaccaccac	1500
cacccgcccc acgaccggac gatgtcgac gacccgttctt accgaaagta gtagaaaacc	1560
cacgcctcggtt tcgcctcggtt tcgggttgtt tcgctgtatgtt acttggactgtt ggggtctgcc	1620

Page 10

ggaccgggggt gggcctcgt gatggtcggg atgcggggtg ggtccctgaa acggcgatg	1680
gccaggccgc ctcccgccca ctcaagtcg tcttcgcggc tgccggacg gatggtcgtc	1740
ccggtcttag tcgacatgtt gtcgacttg gacccgtctt cccttctcat gctgcaggac	1800
ctattcgctt ctccggccct gggactctac ccgcccgtcg gagccgcctt cttgggggtc	1860
cttccggaca tattgcttga cgtctttctg ttctaccggc tccggatgtc gctctagccg	1920
tacttccgc tcgcctccgc cccgttcccg gtgctgccc acatagtccc ggacaggtgg	1980
cggtggttcc tatggatgct gcgggacgtg tacgtccggg acgggggttc 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
 130 135 140

Ser Gly Gly Gly Ser 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
 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 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 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

Page 13

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 Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser 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

<400> 11

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

Gly Gly Ser 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 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 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
 580 585 590 595
 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

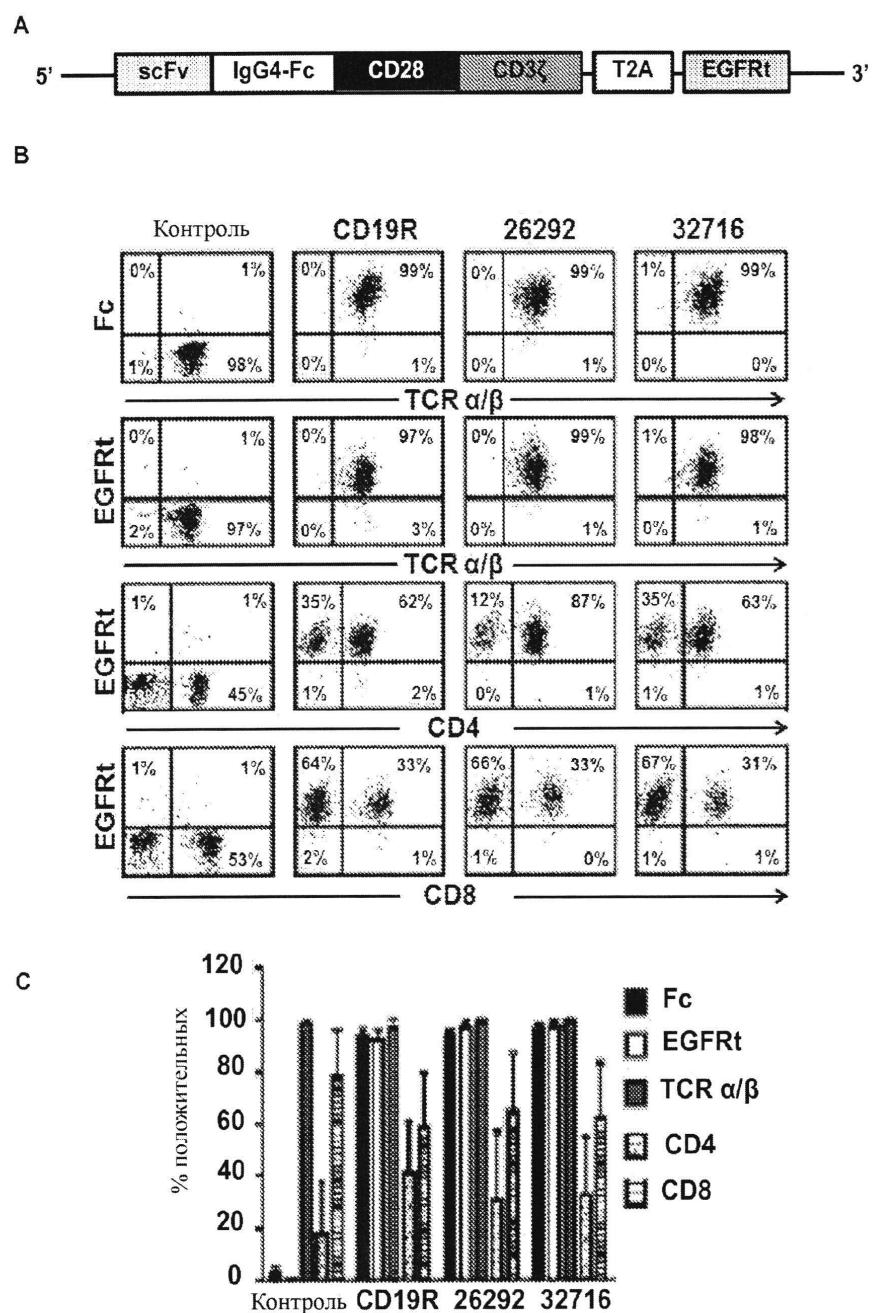
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
180 185 190

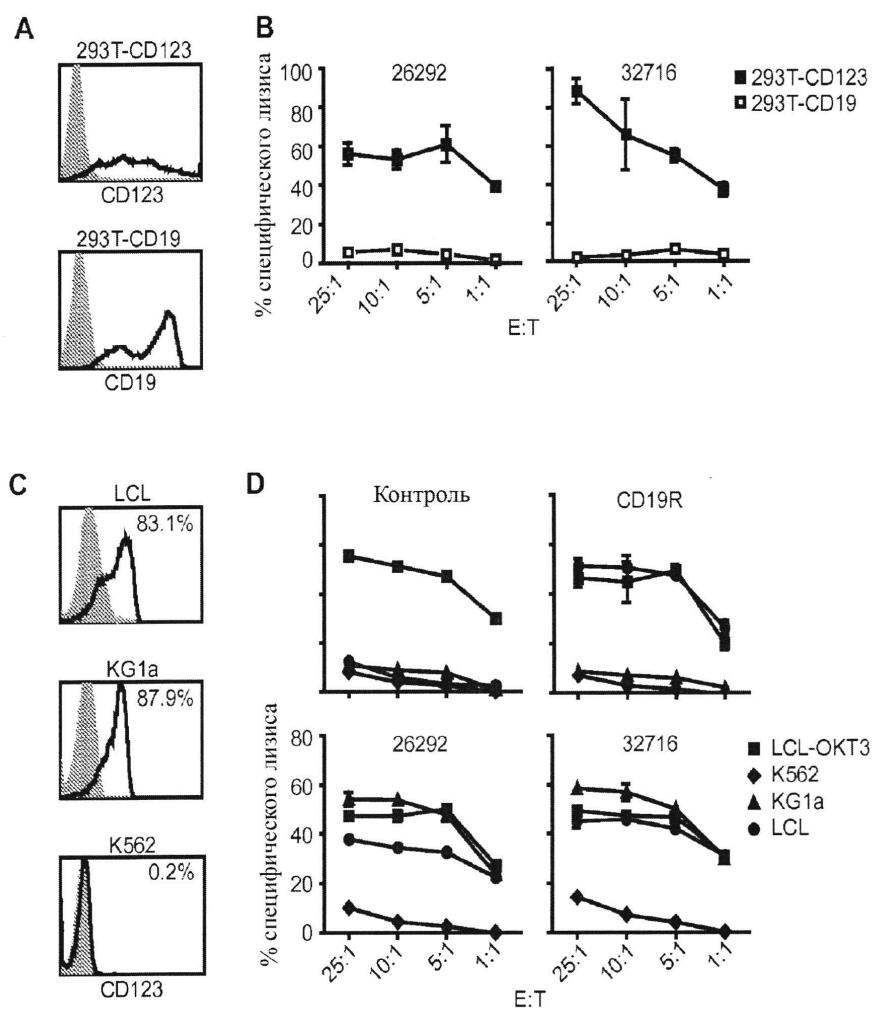
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220

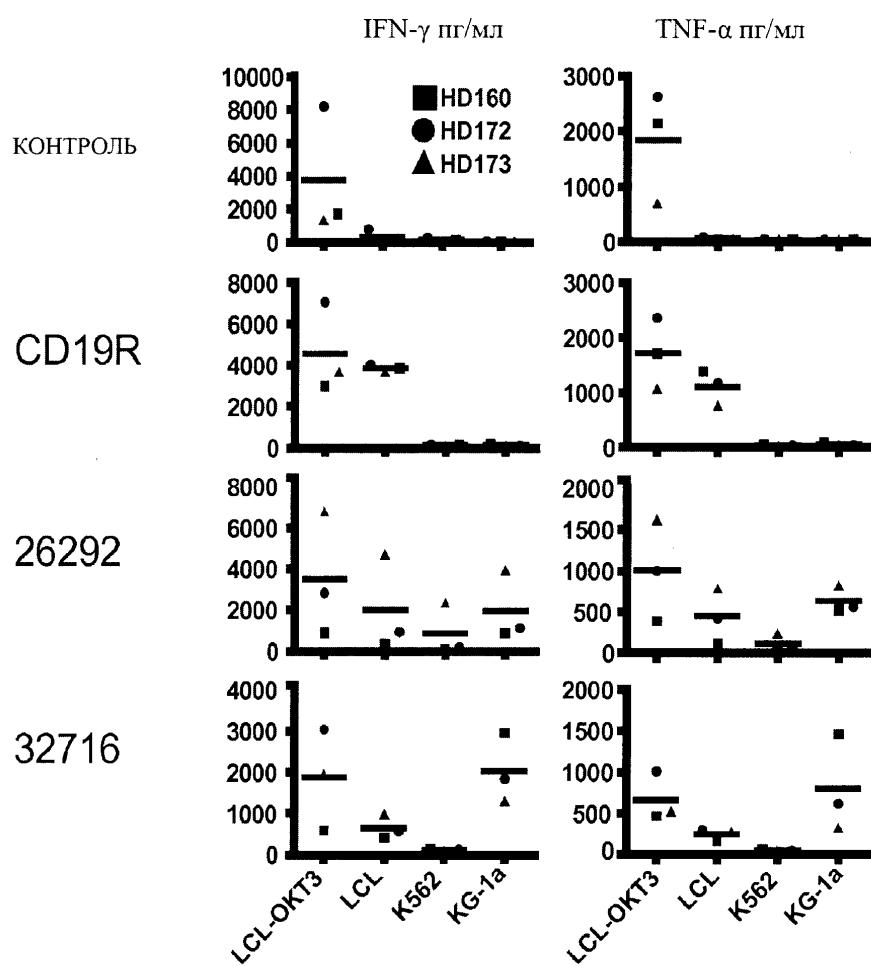
Leu Ser Leu Gly Lys
225



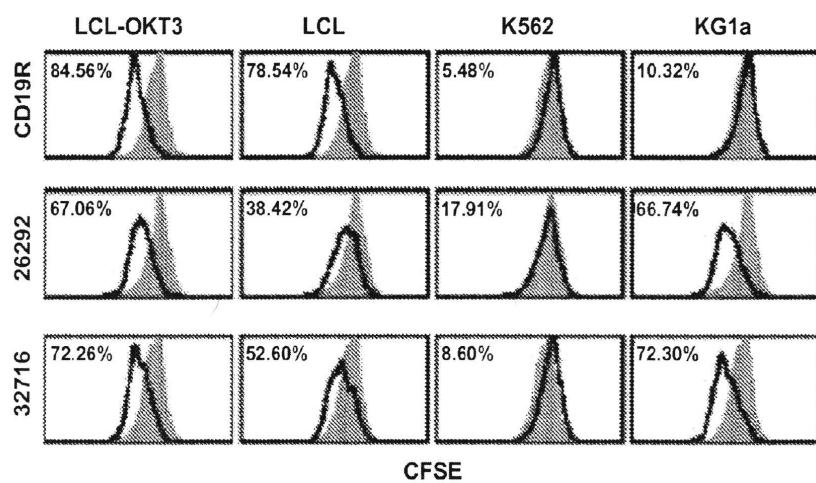
ФИГ. 1



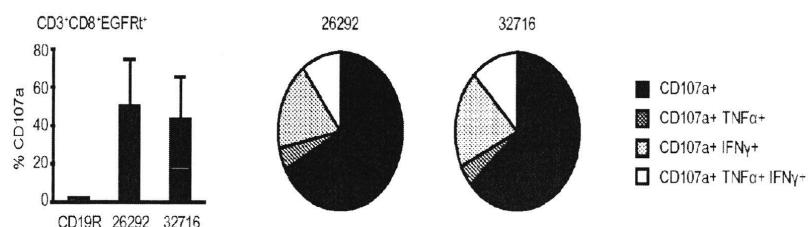
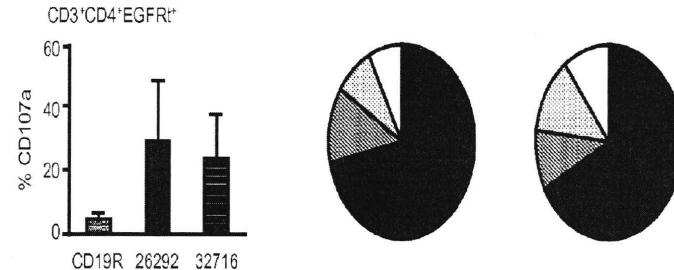
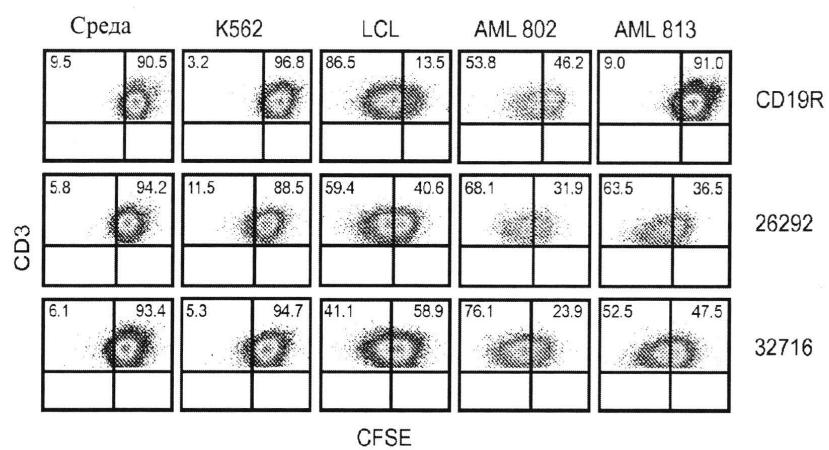
ФИГ. 2

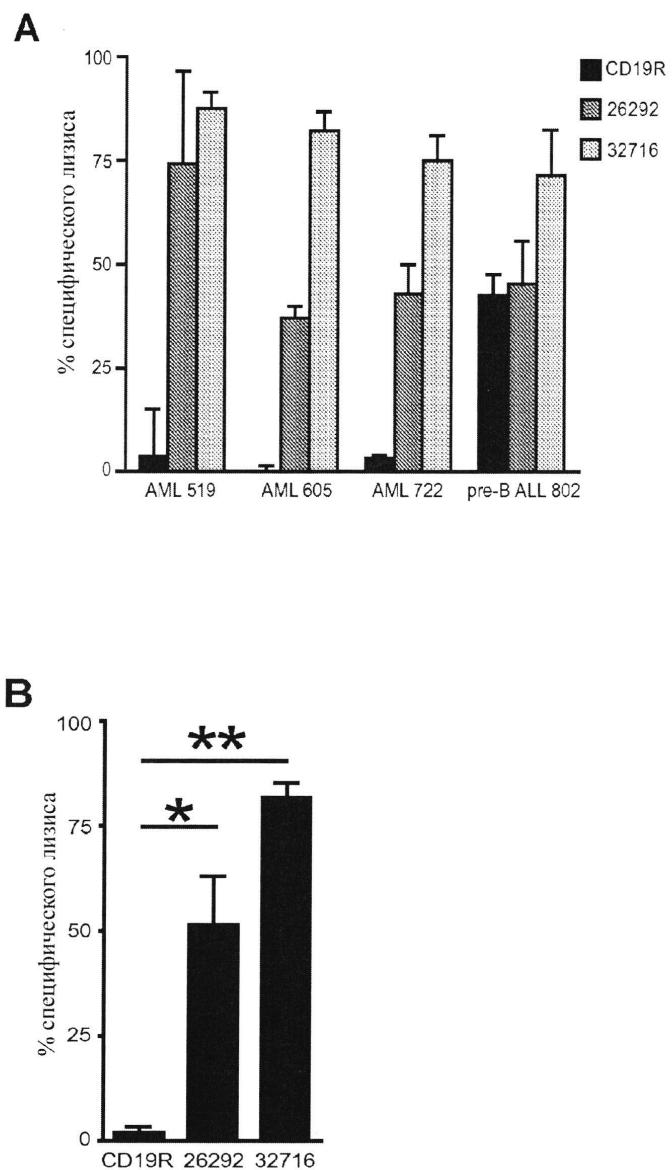


ФИГ. 3А

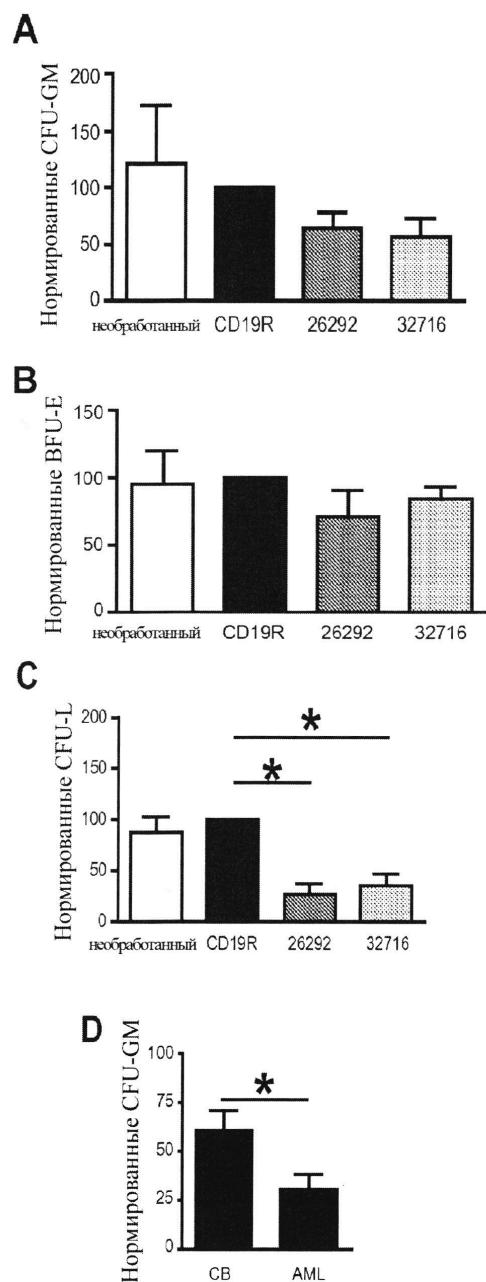


ФИГ. 3В

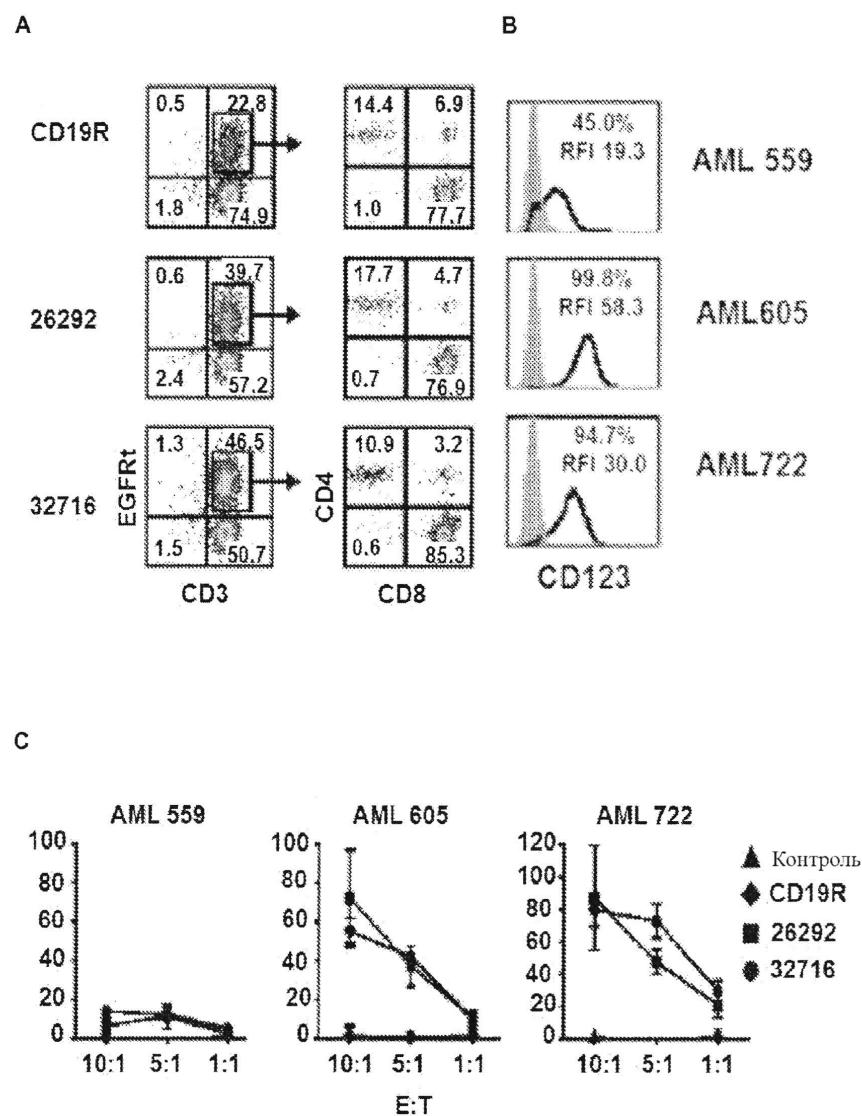
A**B****C****ФИГ. 4**



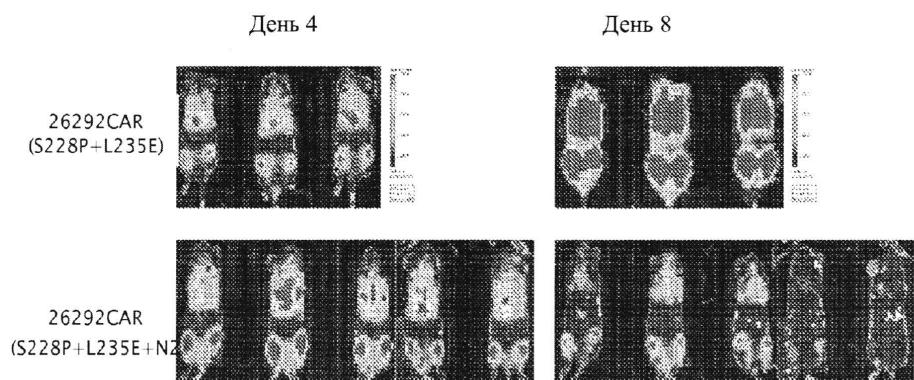
ФИГ. 5



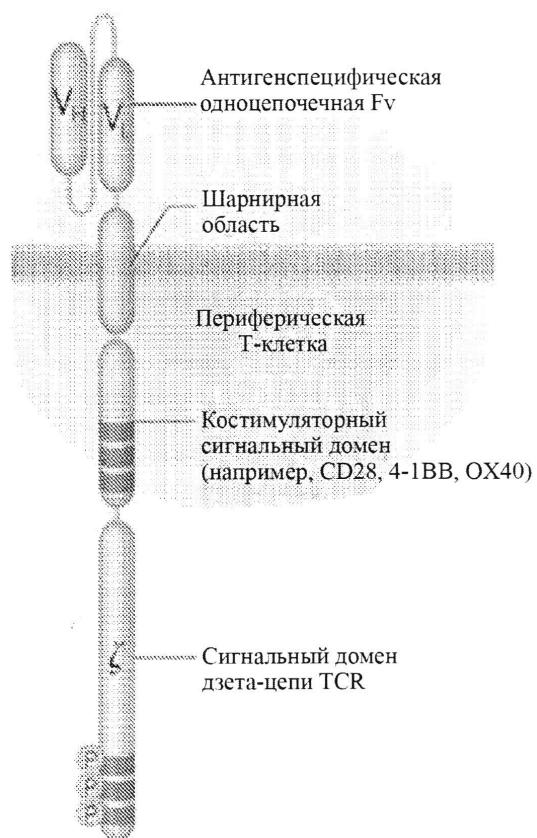
ФИГ. 6



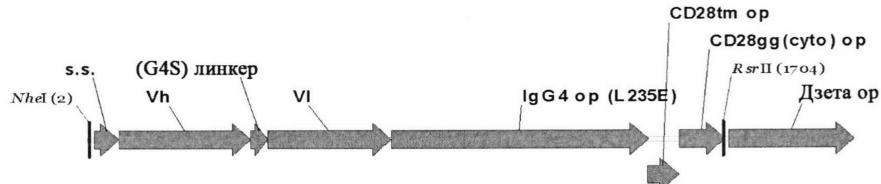
ФИГ. 7



ФИГ. 8



ФИГ. 9



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

2052 bp
 Нhe I ↓~~~~~ Сигнальная последовательность субъединицы альфа GMCSFR →
 M L L L V T S L L L C E L P H

1	GCTAGCGCCG	CCACCATGCT	GCTGCTGGTG	ACCAGCTGTC	TGCTGTGCGA	GCTGCCAAC
	CGATCGCGGC	GGTGGTACGA	CGACGACACC	TGGTCGGACG	ACGACACGCT	CGACGGGGTG
	Vh (32716)→					
	P A F L L I P	Q I Q L V Q S	G P E L K K			
61	CCCGCCCTTC	TGCTGATCCC	CCAGATTCA	CTGGTGCAGA	GCGGCCGGA	ACTGAAAAAA
	GGGCGGAAAG	ACGACTAGGG	GGTCTAA	GACCACG	TGCCGGCCT	TGACTTTTTT
	P G E T V K I	S C K A S G Y	I F T N Y G			
121	CCGGGGCAA	CCGTGAAAAT	TAGCTGCAA	GCGAGCGCT	ATATTTTAC	CAACTATGGC
	GGCCCGCTT	GGCACTTTA	ATCGACGTT	CGCTCGCCG	TATAAAAATG	GTTGATACCG
	M N W V K Q A	P G K S F K W	M G W I N T			
181	ATGAACGGG	TGAAACAGGC	GCGGGGCAA	AGCTTTAAAT	GGATGGGCTG	GATTAACACC
	TACTTGACCC	ACTTTGTCGG	CGGCCCCGTT	TCGAAATT	CCTACCCGAC	CTAATTGTGG
	Y T G E S T Y	S A D F K G R	F A F S L E			
241	TATACCGGGCG	AAAGCACCTA	TAGCGCGGAT	TTTAAAGGCC	GCTTTCGCTT	TAGCGCTGAA
	ATATGGCGC	TTTCGTTGGAT	ATCGCGCTA	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	GCACCGCGTA	TCTGCATATT	AAAGCATCTGA	AAAACGAAGA	TACCGCGACC
	TGGTCGCGCT	CGTGGCGCAT	AGACGTATAA	TTGCTAGACT	TTTTGCTCTT	ATGGCGCTGG
	Y F C A R S G	G Y D P M D Y	W G Q G T S			
361	TATTTCGCG	CGCGCAGCGG	CGCTATGAT	CCGATGGATT	ATTGGGCCA	GGGACACAGC
	ATAAAAAACG	CGCGCTCGCC	GGCGTACTA	GGCTACCTAA	TAACCCGGT	CCCGTGGTCG

421 V T V S G G G G G S G G G G G S G G G G G G S
 GTGACCGTGA GCAGCGGCGG CGCGGCGACG GGCGGCGCG GCAGCGGCGG CGCGGCGACG
 CCTGGCGACT CCTGGCGGCC CGCGGCCGCG CCTGGCGGCC CGCGGCCGCG CCTGGCGGCC CGCGGCCGCG

CACTGGCACT CGTCGCCGCC CGCCGCCGTCG CGCGCCGCC CGTCGCCGCC GCGGCCGTC
V1 (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 GCCTGGGCC GCGCGCAGCC
 CTATAAACACG ACTGGGTCTC GGGCCGCTCG GACCGCCACT CGGACCCGGT CGCGCGCTGG
 I S C R A S E S V D N N Y G N T F M H W Y
 541 ATTAGCTGCC GCGCGAGCGA AAGCGTGGAT AACTATGGCA ACACCTTAT GCATTGGTAT
 TAATCGACGG CGCGCTCGCT TTGCGACCTA TTGATACCGT TGTGAAATA CGTAACCCATA
 Q Q K P G Q P P K L L I Y R A S N L E S
 601 CAGCAGAAAC CGGGCCAGCC GCGCAAACCTG CTGATTATC GCGCGAGCAA CCTGGAAAGC
 GTCGTCTTG GCCCGCTCGG CGGCTTGA GACTAAATAG CGCGCTCGT GGACCTTTCG
 G I P A R F S G S G S R T D F T L T I N
 661 GGCCATTCCGG CGCGCTTCTAG CGCGAGCGGC AGCCGCACCG ATTTTACCTT GACCATTAAC
 CGCGTAAAGGCC CGCGGAAATC GCGGTGCGCC TCGCGCTGGC TAAAATGGGA 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 GGCACCTAT TATTGCCAGC AGAGAACGA AGATCCGCCG
 GGCCACCTTC GCCTACTACA CCGCTGGATA ATAACGGTCG TCTCGTTGCT TCTAGGCGGC
IgG4 op (L235E) →
 T F G A G T K L E L K E S K Y G P P C P
 781 ACCTTTGGCG CGGGCACCAA ACTGGAAC TG AAAGAGAGCA AGTACGGCCC TCCCTGCC
 TGGAAACCGC GCCCCGTGGT TGACCTGAC TTTCTCTCGT TCATGCCGGG AGGGACGGGG
[E] C P A P E F [E] G G P S V F L F P P K P
 841 CCTTGGCTG CCCCCGAGTG CGAGGGCGGA CCCAGCGTGT TCCCTGTTCCC CCCAAGCCC
 GGAACGGGAC GGGGGCTCAA GCTCCCGCT GGGTCGACA 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 CGGGACCCC GAGGTGACCT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC
 TTCCCTGTTGG ACTACTAGTC GGCCTGGGG CTCCAAGTGA CGCACCA CCTGCACTCG
 Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A
 961 CAGGAAGATC CCGAGGTCGA GTTCAATTGG TACGTGGACG GCGTGGAAAGT GCACAAACGCC
 GTCTTCTAG GGCTCCAGGT CAAGTTAACG ATGCACCTGC CGCACCTCA CGTGTGCGG
 K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T
 1021 AAGACCAAGC CCAGAGAGGA ACAGTTCAAC AGCACCTACC GGGTGGTGTGTC TGTGCTGACC
 TTCTGGTTCG GGTCTCTCCT TGTCAAGTTG TCGTGGATGG CCCACCACAG ACACGACTGG
 V L H Q D W L N G K E Y K C V K S N K G
 1081 GTGCTGCACC AGGACTGGCT GAACGGAAA GAATACAAGT GCAAGGTGTC CAACAAGGGC
 CACGACGTGG TCCTGACCGA CTTGCCGTTT CTTATGTTCA CGTTCCACAG GTTGTCCCG
 L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q
 1141 CTGCCCCAGCA GCATCGAAAA GACCATCAGC AAGGCCAAGG GCCAGCCTCG CGAGCCCCAG
 GACGGGTGCT CGTAGCTTT CTGGTAGTCG TTCCGGTTCC CGTCGGAGC GCTGGGGTC
 V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C
 1201 GTGTACACCC TGCCCTCCCTC CCAGGAAGAG ATGACCAAGA ACCAGGTGTC CCTGACCTGC
 CACATGTGG ACGGAGGGAG GGTCTCTCTC TACTGGTCT TGGTCCACAG GGACTGGACG
 L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P
 1261 CTGGTGAAGG GCTCTACCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA CGGCCAGCCT
 GACCACTCC CGAAGATGGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCCTCGTT GCCGGTCGGA
 E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y
 1321 GAGAACAACT ACAAGACAC 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 AGCGGGCTGA CGGTGGACAA GAGCGGGTGG CAGGAAGGCA ACAGTCTTTAG CTGCAGCGTG
 TCGGCCGACT GGCACTGTT CTCGGCCACC GTCCCTCCGT TGAGAAATC 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 GTCTCTCGG ACTCGGACAG GGACCCGTT
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 GGTGGGGGG GTGCTGGCT GCTACAGCCT GCTGGTGACA
 TACAAGACCC ACGACCACCA CCACCCGCC 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 GTGGCCTCA TCATCTTTG GGTGCGGAGC AAGCGGAGCA GAGGCGGCCA CAGCGACTAC
 CACCGGAAGT AGTAGAAAAC CCACGCTCG TTGCGCTCGT CTCCGCCGGT GTGCGTGTGATG
 M N M T P R R P G P T R K H Y Q P Y A P
 1621 ATGAACATGA CCCCCAGACG GCCTGGCCCG ACCCGGAAGC ACTACCAGCC CTACGCCCA
 TACTTGACT GGGGGCTGC CGGACCGGGG TGGGCCCTCG TGATGGTCGG GATGCGGGGT

ФИГ. 10
(продолжение)

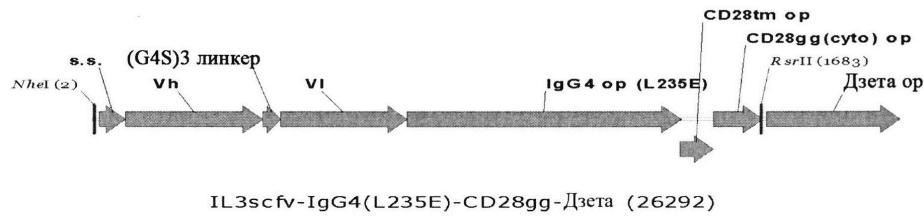
RsrII

~~~~~ ↓

Дзета оп →

P R D F A A Y R S G G G R V K F S R S A  
 1681 CCCAGGGACT TTGCCGCC TA CCGGTCGGC GGAGGGCGGG TGAAGTTCA GAGAAGCGCC  
 GGGTCCCTGA AACGGCGAT GGCCAGGCCG CCTCCCGCCC ACTTCAAGTC GTCTTCGCGG  
 D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N L G R  
 1741 GACGCCCTG CCTACCAGCA GGGCCAGAAT CAGCTGTACA ACGAGCTGAA CCTGGGAGA  
 CTGCGGGAC 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 ACGACGTCT GGATAAGCGG AGAGGCCGGG ACCCTGAGAT GGGCGGCAAG  
 TCCCTTCTCA TGCTGCAGGA CCTATTGCC TCTCCGGCC 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 TCTTGGGGT CCTTCCGGAC ATATTGCTTG ACGTCTTCT 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 CTCCCTCCG 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 GATACTACG ACGCCCTGCA CATGCAGGCC  
 GACATAGTCC CGGACAGGTG GCGGTGGTTC CTATGGATGC TGCGGGACGT GTACGTCCGG  
 L P P R  
 2041 CTGCCCTCAA GG  
 GACGGGGTT CC

**ФИГ. 10**  
(продолжение)



NheI  
Сигнальная последовательность субъединицы альфа GMCSFR →

1 GCTAGCGCCG CCACCATGCT GCTGCTGGTG ACCAGCTCTGC TGCTGTGCGA GCTGCCCCAC  
CGATCGCGC GGTGGTACGA CGACGACAC TGTCGAGG ACGACACGCT CGACGGGGTG

61 P A F L L I P Q V Q L Q Q P G A E L V R  
CCCGCCTTC TGCTGATCCC CCAGGTGAG CTGCAGCAGC CGGGCGCGGA ACTGGTGC  
GGCGCGAAAG ACGACTAGGG GGTCCACGTC GACGTCTCG GCCCCGCCCT TGACCA  
P G A S V K L S C K A S G Y T F T S Y W  
121 CCGGGCGCGA GCGTGAAGT GAGCTGCAAA GCGAGCGGCT ATACCTTAC CAGCTATTGG  
GGCCCGCGCT CGCACTTTGA CTCGACGTT CGCTCGCCGA TATGAAATG GTGATAACC  
M N W V K Q R P D Q G L E W I G R I D P  
181 ATGAACTGGG TGAAACAGCG CCGGATCAG GGCTGGAAT GGATGGCGG CATGATCCG  
TACTTGACCC ACTTTGTCG 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 TTTGGTAAT ATTGGTCTT AAATTTCTAT 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 TATGCGAGCTG ACCAGCCTGA CCAGCGAAGA TAGCGCGGTG  
TTTCGTCGT CGTGGCGCAT ATACGTCGAC TCGTGGACT 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 TATTGGGCC AGGGCACCAC CCTGACCGTG  
ATAATAACGC GCGCGCCGTT GACCTACTA ATAACCCCGG TCCCGTGGTG GGACTGGCAC

G4S линкер →

421 S S G G G G S G G G G S G G S D V Q  
AGCAGCGGC CGGGCGGCAG CGGGCGCGGC GGCAGCGGC CGGGCGGCAG CGATGTGCAG  
TCGTCGCGC CGCCCGCGTC GCGCCCGCG CGTCGCGC CGCCCGCGTC GCTACACGTC  
I T Q S P S Y L A A S P G E T I T I N C  
481 ATTACCCAGA GCCCGAGCTA TCTGGCGCG AGCCCGGGCG AAACCATTA CATTAACG  
TAATGGGTCT CGGGCTCGAT AGACCGCGC TCGGGCGGC 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 CGCTGGTATC AGGAAAAAACC GGGCAAAC  
GCGCCTCGT TTTCGTAATC GTTTCTAGAC CGCACCATAG TCCTTTTG CGCTTTTG  
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 GCATTCGAG CGCTTTAGC  
TTGTTGACG ACTAAATATC GCGCTCGT GACGTCTCG CGTAAGGCTC GGCAAATCG  
G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F  
661 GGCAGCGGCAGA CGGGCACCAGA TTTTACCTG ACCATTAGCA GCCTGGAACC GGAAGATTT  
CCGTCGCGCT CGCGTGGCT AAAATGGAC TGTAATCGT CGGACCTTGG CCTCTAA  
A M Y Y C Q Q H N K Y P Y T F G G G G T K  
721 GCGATGTATT ATTGCGAGCA GCATAACAAA TATCCGTATA CCTTTGGCGG CGGCACCAAA  
CGCTACATAA TAACGGTCGT CGTATTGTT ATAGGCATAT GGAAACCGCC GCGGTGGTT

V1 (26292) →

ФИГ. 11

IgG4 op (L235E) →

781 L E I K E S K Y G P P C P **P** C P A P E F  
 CTGGAAATT AAGAGAGCAA GTACGGCCCT CCCTGCCCTGC CCCCAGGTT  
 GACCTTAAT TTCTCTCGTT CATGCCGGGA GGGACGGGG 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 AGGACACCCCT GATGATCAGC  
 CTCCCGCCTG GGTGCAACAA GGACAAGGGG GGGTTCGGGT TCCGTGGGA 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  
 GCCCTGGGGC TCCACTGGAC GCACCAACAC CTGCACTCGG CCTCTCTAGG 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 TGACACCTGCC GCACCTTCAC GTGGTGGGT 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  
 GTCAAGTGT CGTGGATGGC CCACCAACAGA 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 AACAAAGGGCC TGCCGAGCAG CATCGAAAAG  
 TTGCGTTTC TTATGTTAC GTTCCACAGG TTGGTCCCGG ACGGGTCGTC GTAGCTTTTC  
 T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S  
 1141 ACCATCAGCA AGGCAAGGG CCAGCCTCGC GAGCCCCAGG TGTACACCCCT GCCTCCCTCC  
 TGGTAGTCGT TCCGGTTCCC GGTGGAGCG CTGGGGTCC ACATGTGGGA CGGAGGGAGG  
 Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P  
 1201 CAGGAAGAGA TGACCAAGA CCAGGTGTCC CTGACCTGCC TGGTGAAGGG CCTTCTACCCC  
 GTCTTCTCT ACTGGTCTT GGTCCACAGG GACTGGACGG ACCACCTCC GAAGATGGGG  
 S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T  
 1261 AGCGACATCG CGGTGGAGTG GGAGAGCAAC GGCCAGCTG AGAACAACTA CAAGACCAAC  
 TCGTGTAGC GGCAACCTAC CCTCTCGTT CGGTGCGAC TCTTGTGAT GTTCTGGTGG  
 P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K  
 1321 CCTCCCGTGC TGGACAGGA CGGCAGCTC TTCTGTACCA GCGGCTGAC CGTGGACAAG  
 GGAGGGCACG ACCTGTCGCT GCGTCAAG AAGGACATGT CGCCGACTG GCACCTGTT  
 S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N  
 1381 AGCCGGTGGC AGGAAGGCAA CGTCTTACG TGCAAGCTGA TGCAAGGAGG CCTGCACAC  
 TCGGCCACCG TCCCTCCCGT 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 GAGCTGTCC CTGGGCAAGA TGTTCTGGGT GCTGGTGGTG  
 GTGATGTGGG TCTTCTCGGA CTCGGACAGG GACCCGTCT ACAAGACCCA CGACCAAC  
 V G G V L A C Y S L L V T V A F I I F W  
 1501 GTGGGCGGGG TGCTGGCTG CTACAGCCTG CTGGTACAG TGGCCTTCAT CATCTTTGG  
 CACCCGCCACG ACGACGGAC GATGTCGGAC GACCACTGTC ACCGGAAAGTA GTAGAAAACC

CD28g (cyto) op →

1561 V R S K R S R **G** H S D Y M N M T P R R  
 GTGCCGAGCA AGCGGAGCAG AGGCCGCCAC AGCGACTACA TGAACATGAC CCCCAGACGG  
 CACGCCCTCGT 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 CCTGGCCCA CCCGGAAAGCA CTACCAAGCCC TACGCCAAC CCAGGGACTT TGCCGCCCTAC  
 GGACGGGGGT GGGCCTTCGT GATGGTCGGG ATGCCGGGTG GGTCCCTGAA ACGGCGGATG  
 RstII ↓

Дзета op →

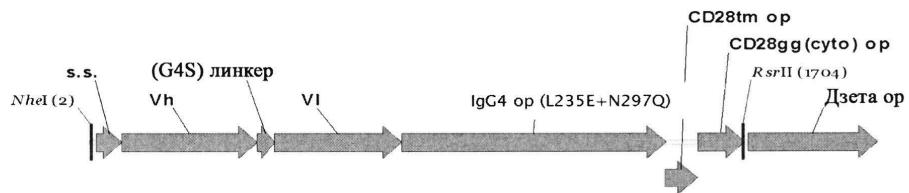
1681 R S G G G R V K F S R S A D A P A Y Q Q  
 CGGTCCGGCG GAGGGCGGGT GAAGTTCAGC AGAAGCGCG ACGCCCTGC CTACCAAGCAG  
 GCCAGGCCGC CTCCCGCCCA CTTCAAGTCG TCTTCGGGC TGCGGGGACG GATGGTCGTC

**ФИГ. 11**  
(продолжение)

1741 G Q N Q L Y N E L N L G R R E E Y D V L  
 GCCCAGAAC AGCTGTACAA CGAGCTGAAC CTGGGCAGAA GGGAGAGTA CGACGTCTG  
 CCGGTCTTAG TCGACATGTT GCTCGACTTG GACCCGCTT CCCTCTCAT 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 CTGGCGGAA GAACCCCCAG  
 CTATTCGCT CTCCGGCCCT GGGACTCTAC CCGCCGTCG GAGCCGCTT CTTGGGGTC  
 E G L Y N E L Q K D K M A E A Y S E I G  
 1861 GAAGGCCTGT ATAACGAAC GCAGAAAGAC AAGATGGCG AGGCCTACAG CGAGATCGGC  
 CTTCCGGACA TATTGCTTGA CGTCTTTCTG TTCTACCGC TCCGGATGTC GCTCTAGCCG  
 M K G E R R R G K G H D G L Y Q G L S T  
 1921 ATGAAGGGCG AGCGGAGGC GGGCAAGGG CACGACGGCC TGTATCAGGG CCTGTCCACC  
 TACTTCCCGC TCGCCTCCGC CCCGTTCCCG GTGCTCCGG ACATAGTCCC GGACAGGTGG  
 A T K D T Y D A L H M Q A L P P R  
 1981 GCCACCAAGG ATACCTACGA CGCCCTGCAC ATGCAGGCC TGCCCCAAG G  
 CGGTGGTTCC TATGGATGCT GCGGGACGTG TACGTCCGGG ACGGGGGTTC C

**ФИГ. 11**  
(продолжение)

32716 32716 32716 32716 32716 32716



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

2052 bp

NheI  
~~~~~

Сигнальная последовательность субъединицы альфа GMCSFR →

M L L L V T S L L L C E L P H
 1 GCTAGCGCCG CCACCATGCT GCTGCTGGTG ACCAGCTCTG TGCTGTGCGA GCTGCCAC
 CGATCGCGC GGTGGTACGA CGACGACAC TGTCGGACG ACGACACGCT CGACGGGTG
Vh (32716) →
 P A F L L I P Q I Q L V Q S G P E L K K
 61 CCCGCCTTC TGCTGATCCC CCAGATTCACT CGCTGCTGAGA GCGGCCCGGA ACTGAAAAAA
 GGGCGAAAG ACGACTAGGG GGTCTAAGTC GACCACGCT CGCCGGGCCT TGACTTTTTT
 P G E T V K I S C K A S G Y I F T N Y G
 121 CGGGCGAAA CGGTGAAAAT TAGCTGAAA GCGAGCGGCT ATATTTTAC CAACTATGGC
 GGCCGCTTT GGCACTTTTA ATCGACGTTT CGCTGCCGA TATAAAATG GTTGATACCG
 M N W V K Q A P G K S F K W M G W I N T
 181 ATGAACCTGGG TGAAACAGGC GCGGGGCAA AGCTTTAAAT GGATGGGCTG GATTAACACC
 TACTTGACCC ACTTTGTCCG CGGCCGCTTT TCAGAAATTAA 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 GCTTGCCTT TAGCCTGGAA
 ATATGCCGC TTTCTGTGGAT ATCGCGCTTA AAATTCGG CGAACACGCAA 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 TATTTTGCG CGCGCAGCGG CGGCTATGAT CCGATGGATT ATTGGGGCCA GGGCACCGAC
 ATAAAAACGC GCGCGTCGCC CGCGATACTA GGCTACCTAA TAACCCGGT CCCGTGGTCG

G4S линкер →

V T V S S G G G G S G G G G S G G G G G G S
 421 GTGACCGTGA CGAGCGCGG CGCGCGCAGC GGCGCGCGC GCAGCGCGG CGCGCGCAGC
 CACTGGCACT CGTCGCCGC CGCGCGCTCG CGCGCGCCGC CGTCGCCGCC CGCGCGCTCG

VI (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 GGGCGCTCG 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 ACACCTTAT GCATTGGTAT
 TAATCGACGG CGCGCTCGCT TTGACCTTA TTGATACCGT TGTGGAAATA CGTAACCATA
 Q Q K P G Q P P K L L I Y R A S N L E S
 601 CAGCAGAAAC CGGGCGAGCC GCGGAAACTG CTGATTATC CGCGGAGCAA CCTGGAAAGC
 GTCGTCTTTG GCGCGCTCGG 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 ATTTTACCCCT GACCATTAAC
 CGCTAAGGCC CGCGGAAATC GCGCTCGCC CGCGCTGGC 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 CCGGTGAAAG CGGATGATGT GGCGACCTAT TATTGCCAGC AGAGCAACGA AGATCCGCCG
 GGCCACCTTC GCCTACTACA CCGCTGGATA ATAACGGTCG TCTCGTTGCT TCTAGGCCGC
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 ACTGGAACGT AAAGAGAGCA AGTACGGCCC TCCCCTGCCCG
 TGGAAACCGC GCCCCGTGGTT TGACCTTGAC TTTCTCTCGT TCATGCCGGG AGGGACGGGG
 [E] C P A P E F [E] G G P S V F L F P P K P
 841 CCTCTGCCCTG CCCCCGAGTT CGAGGGCGGA CCCAGCGTGT TCCCTGTTCCC CCCCAAGCCC
 GGAACGGGAC GGGGGCTAA GCTCCCGCCT GGGTCAACCA 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
 TTCCCTGTGGG ACTACTAGTC GGCCCTGGGG 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 GCGTGGAAAGT GCACAACGCC
 GTCCCTCTAG GGCTCCAGGT CAAGTTAACC ATGACACTGC CGCACCTTC CA GTGTTGCCGG
 K T K P R E E Q F [Q] S T Y R V V S V L T
 1021 AAGACCAAGC CCAGAGAGGA ACAGTTCCAR AGCACCTACC GGGTGGTGTG TGTGCTGACC
 TTCTGGTTCG GGTCTCTCT TGTCAAAGTY TCGTGGATGG CCCACCCACAG ACACGACTGG
 V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G
 1081 GTGCTGCACC AGGACTGGCT GAACGCCAAA GAATACAAGT GCAAGGTGTC CAACAAGGGC
 CACGACGTGG TCCTGACCGA CTTGCCCTT CTTATGTTCA CGTTCCACAG GTTGTCCCG
 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
 GACGGGTCTGT CGTAGCTTT CTGGTAGTCG TTCCGGTTCC CGGTGGAGC GCTCGGGGTC
 V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C
 1201 GTGTACACCC TGCCCTCCCT CCAGGAAGAG ATGACCAAGA ACCAGGTGTC CCTGACACTGC
 CACATGTGGG ACGGAGGGAG GGTCTCTCTC 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 GCGTGGAGT GGGAGAGCAA CGGCCAGCCT
 GACCACTCC CGAAGATGGG GTGCGTAG CGGCACCTCA CCCCCTCGTT GCCGGTCCGG
 E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y
 1321 GAGAACAACT ACAAGACAC CCCTCCCGTG CTGGACAGCG ACGGCAGCTT CTTCTGTAC
 CTCTTGTTGA TGTTCTGGTG GGGAGGGAC GACCTGTCGC TGCCGTGAA 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 ACGCTTTAG CTGCAGCGTG
 TCGGCCGACT GGCACCTGTT CTCCGGCACC GTCCCTCGT TGCAAGAAC GACGTGGCAC
 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 CCTGGCAAG
 TACGTGCTCC GGGACGTGTT GGTGATGTGG GTCTCTCGG ACTCGGACAG GGACCCGTT
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 GGTGGGGGG GTGCTGGCT GCTACAGCCT GCTGGTGACA
 TACAAGACCC ACGACCAACCA CCACCCGCC CACGACCGGA CGATGTCGGA CGACCAACTG
CD28gg (cyto) op →
 V A F I I F W V R S K R S R [G] H S D Y
 1561 GTGGCCTCA TCATCTTTG GGTGCGGAGC AAGCAGGAGCA GAGGGGGCCA CAGCGACTAC
 CACCGGAAGT AGTAGAAAAAC CCACGCCCTCG TTGCGCTCGT CTCCGGCGGT GTGCGTGTATG
 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 ACTACCAGCC CTACGCCCA
 TACTTGACT GGGGGCTGC CGGACCGGGG TGGGCCCTCG TGATGGTCGG GATGCGGGGT

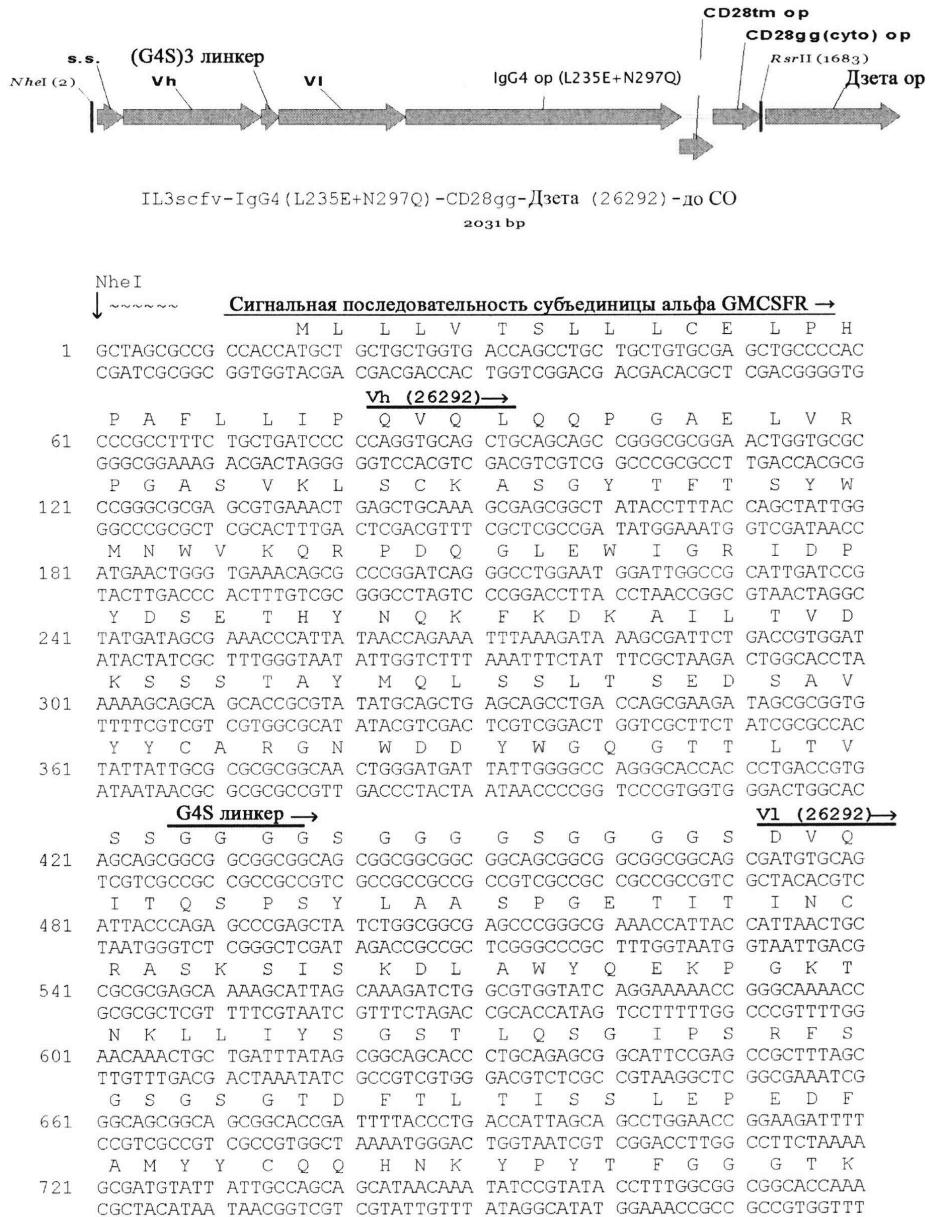
ФИГ. 12
(продолжение)

RsrII

~~~~~↓      Дзета ор →

|      |            |            |             |             |            |            |            |            |            |            |            |             |            |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|------|------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| P    | R          | D          | F           | A           | A          | Y          | R          | S          | G          | G          | G          | R           | V          | K | F | S | R | S | A |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 1681 | CCCAGGGACT | TTGCCGCC   | TA          | CCGGTCCGGC  | GGAGGGCGGG | TGAAGTTCA  | CAGAAGCGCC | GGGTCCCTGA | AACGGCGGAT | GGCCAGGGCG | CCTCCCGCCC | ACTCAAGTC   | GTCCTCGCGG | D | A | P | A | Y | Q | Q | G | Q | N | Q | L | Y | N | E | L | N | L | G | R |
| 1741 | GACGCCCTG  | CCTACCAGCA | GGGCCAGAAAT | CAGCTGTACA  | ACGAGCTGAA | CTGGGGCAGA | 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  | ACCTTGAGAT | GGGCGGCAAG | TCCCTCTCA  | TGCTGCAGGA | CCTATTGCC  | TCTCCGGCCC | TGGGACTCTA | CCCGCCGTTC  | P          | R | R | K | N | P | Q | E | G | L | Y | N | E | L | Q | K | D | K | M | A |   |
| 1861 | CCTCGGCGGA | AGAACCCCCA | GGAAAGGCCTG | TATAACGAAC  | TGAGAAAGA  | CAAGATGGCC | GGAGCCGCCT | TCTTGGGGGT | CCTTCCGGAC | ATATTGCTTG | ACGTCTTTCT | GTTCCTACCGG | E          | A | Y | S | E | I | G | M | K | G | E | R | R | R | G | K | G | H | D | G |   |
| 1921 | GAGGCCTACA | GCGAGATCGG | CATGAAGGGC  | GAGCAGGAGGC | 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 | GCTGTCCAC  | CGCCACCAAG  | GATACTACG   | ACGCCCTGCA | CATGCAGGCC | GACATAGTCC | CGGACAGGTG | CGGGTGGTTC | CTATGGATGC | TGCGGGACGT | GTACGTCCGG  | L          | P | P | R |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 2041 | CTGCCCCCAA | GG         | GACGGGGGTT  | CC          |            |            |            |            |            |            |            |             |            |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |

**ФИГ. 12**  
(продолжение)



ФИГ. 13

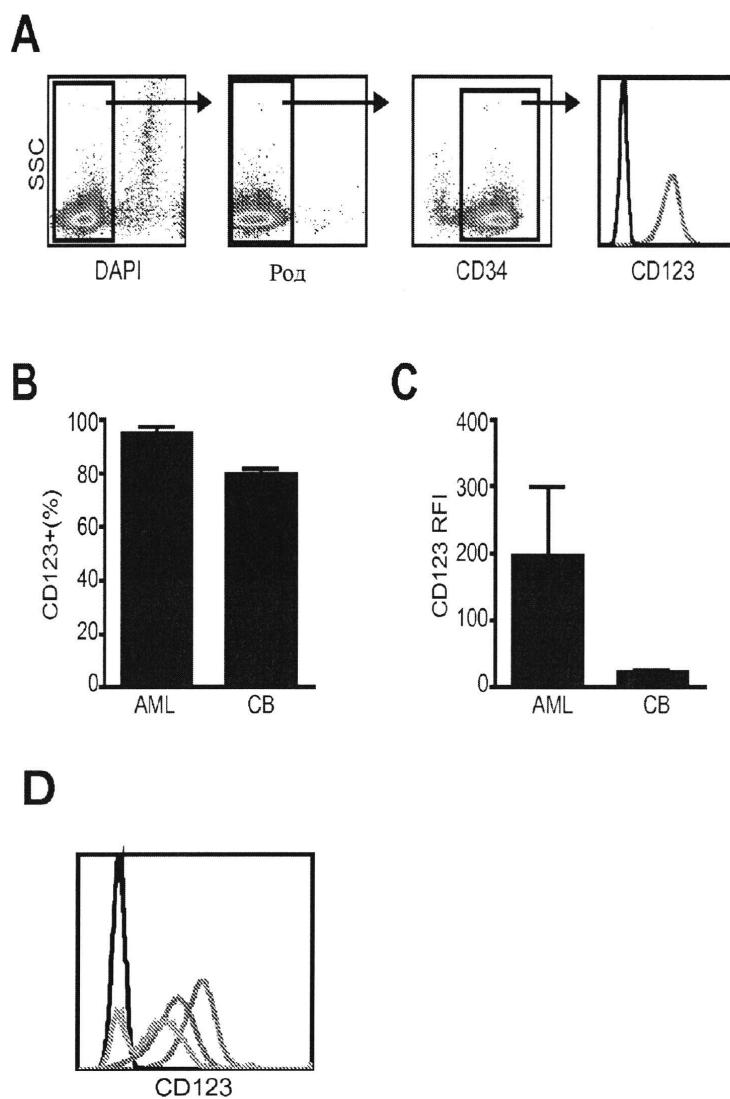
IgG4 op (L235E) →

|      |                      |             |             |             |                           |
|------|----------------------|-------------|-------------|-------------|---------------------------|
| 781  | CTGGAAATTAAAGAGAGCAA | GTACGGCCCT  | CCCTGCCCCC  | CTTGCCCTGC  | CCCCGAGGTC                |
|      | GACCTTTAAT           | TTCTCTCGTT  | CATGCCGGGA  | GGGACGGGGG  | GAACGGGACG                |
| 841  | <b>E</b> GGPSSVFLFP  | PKPK        | D T L       | M I S       |                           |
|      | GAGGGCGGAC           | CCAGCGTGT   | CCTGTTCCC   | CCCAAGCCA   | AGGACACCT                 |
|      | CTCCCGCCTG           | GGTCGCACAA  | GGACAAGGGG  | GGGTCGGGT   | TCCGTGGGA                 |
|      | R T P E              | V T C       | V V         | D V S Q     | E D P                     |
|      | CGGACCCCCG           | AGGTGACCTG  | CGTGGTGGT   | GACGTGAGCC  | AGGAAGATCC                |
| 901  | GCCTGGGGC            | TCCACTGGAC  | GCACCAAC    | CTGCACCTGG  | TCCCTCTAGG                |
|      | F N W Y              | V D G       | V E V       | H N A K     | T K P                     |
| 961  | TTCAATTGGT           | ACGTGGACGG  | CGTGGAAAGTG | CACAAACGCCA | AGACCAAGCC                |
|      | AAGTTAACCA           | TGCACCTGCC  | GCACCTTCAC  | GTGTTGCGGT  | TCTGGTTCGG                |
|      | Q F <b>Q</b> S       | T Y R       | V V S       | V L T V     | L H Q                     |
| 1021 | CAGTTCAAA            | GCACCTTACCG | GGTGGTGTCT  | TGCTGACCC   | TGCTGACCA                 |
|      | GTCAAGT              | CGTGGATGGC  | CCACACAGA   | CACGACTGGC  | ACGACGTGGT                |
|      | N G K E              | Y K C       | K V S       | N K G L     | P S S                     |
| 1081 | AACGGCAAAG           | AATAACAAGTG | CAAGGTGTCC  | AACAAGGGC   | TGCCCAGCAG                |
|      | TTGCCGTTTC           | TTATGTTCAC  | GTTCACAGG   | TTGTTCCCGG  | ACGGGTCGTC                |
| 1141 | T I S K              | A K G       | Q P R       | E P Q V     | Y T L                     |
|      | ACCATCAGCA           | AGGCCAAGGG  | CCAGCCTCGC  | GAGCCCCAGG  | TGTACACCT                 |
|      | TGGTAGTCGT           | TCCGGTTCCC  | GGTCGGAGCG  | CTCGGGTCC   | ACATGTGGGA                |
| 1201 | Q E E M              | T K N       | Q V S       | L T C L     | V K G                     |
|      | CAGGAAGAGA           | TGACCAAGAA  | CCAGGTGTCC  | CTGACCTGCC  | TGGTGAAGGG                |
|      | GTCCCTCTCT           | ACTGGTTCTT  | GGTCCACAGG  | GACTGGACGG  | ACCACTTCCC                |
| 1261 | S D I A              | V E W       | E S N       | G Q P E     | N N Y                     |
|      | AGCGACATCG           | CCGTGGAGTG  | GGAGAGAAC   | GGCCAGCCTG  | AGAACAACTA                |
|      | TCGCTGTAGC           | GGCACCTCAC  | CCTCTCGTTG  | CCGGTCGGAC  | TCTTGTTGAT                |
| 1321 | P P V L              | D S D       | G S F       | F L Y S     | R L T                     |
|      | CCTCCCGTGC           | TGGACAGCGA  | CGGCAGCTTC  | TTCCGTACA   | GCCGGCTGAC                |
|      | GGAGGGCAGC           | ACCTGTCGCT  | GCCGTCGAAG  | AAGGACATGT  | CGGCCGACTG                |
| 1381 | S R W Q              | E G N       | V F S       | C S V M     | H E A                     |
|      | AGCCGGTGGC           | AGGAAGGCAA  | CGTCTTTAGC  | TGCAGCGTGA  | TGACAGGAGC                |
|      | TCGGCCACCG           | TCCTCCGTT   | GCAGAAATCG  | ACGTCGCACT  | ACGTGCTCCG                |
|      |                      |             |             |             | GGACGTGTTG                |
|      |                      |             |             |             |                           |
|      |                      |             |             |             | <u>CD28tm op →</u>        |
| 1441 | H Y T Q              | K S L       | S L S       | L G K M     | F W V                     |
|      | CACTACACCC           | AGAAGAGCCT  | GAGCTGTCC   | CTGGGCAAGA  | TGTTCTGGGT                |
|      | GTGATGTGGG           | TCTTCTCGGA  | CTCGGACAGG  | GACCCGTTCT  | ACAAGACCCA                |
| 1501 | V G G V              | L A C       | Y S L       | L V T V     | A F I                     |
|      | GTGGGGGGG            | TGCTGGCCTG  | CTACAGCTG   | CTGGTGACAG  | TGGCCTTCAT                |
|      | CACCGGGAC            | GATGTCGGAC  | GACCACTGTC  | ACCGGAAGTA  | GTAGAAAACC                |
|      |                      |             |             |             |                           |
|      |                      |             |             |             | <u>CD28gg (cyto) op →</u> |
| 1561 | V R S K              | R S R       | <b>G G</b>  | H S D Y M   | N M T                     |
|      | GTGCGGAGCA           | AGCGGAGCAG  | AGGCAGGCCAC | AGCGACTACA  | TGAACATGAC                |
|      | CACGCCCTCGT          | TCGCCTCGTC  | TCCGGGGT    | TCGCTGATGT  | ACTTGACTG                 |
| 1621 | P G P T              | R K H       | Y Q P       | A P P R D F | A A Y                     |
|      | CCTGGCCCCA           | CCCGGAAGCA  | CTACCAAGCCC | TACGCCAAC   | CCAGGGACTT                |
|      | GGACCGGGGT           | GGGCCTTCGT  | GATGGTCGGG  | ATGCGGGGTG  | GGTCCCTGAA                |
|      | RsrII                |             |             |             | ACGGCGGATG                |
|      | ~~~~~                | ↓           |             |             |                           |
| 1681 | R S G G              | G R V       | K F S       | R S A D     | A P A                     |
|      | CGGTCCGGCG           | GAGGGCGGGT  | GAAGTTCAAG  | AGAAGCGCCG  | ACGCCCTGC                 |
|      | GCCAGGCCG            | CTCCCGCCCA  | CTTCAAGTCG  | TGCGGGGACG  | GATGGTCGTC                |

**ФИГ. 13**  
(продолжение)

1741 G Q N Q L Y N E L N L G R R E E Y D V L  
 GCCAGAAC AGCTGTACAA CGAGCTGAAC CTGGGCAGAA GGGAAAGAGTA 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 GGCAGCAAGC CTGGCGGAA GAACCCCCAG  
 CTATTCCGCT CTCCGGCCCT GGGACTCTAC CCGCCGTTG GAGCCGCCCTT 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 AAGATGGCG AGGCCTACAG CGAGATCGGC  
 CTTCCGGACA TATTGCTTGA CGTCTTTCTG TTCTACCGC 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 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 ATGCAGGCC TGCCCCAAG G  
 CGGTGGTTCC TATGGATGCT GCAGGACGTG TACGTCCGGG ACGGGGGTTC C

**ФИГ. 13**  
*(продолжение)*



ФИГ. 14

