



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

C07K 14/725 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

A61K 47/66 (2017.01)

A61K 47/68 (2017.01)

A61K 47/69 (2017.01)

A61P 35/00 (2006.01)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 14/7051 (2019.02); C07K 16/3084 (2019.02); A61K 35/17 (2019.02); A61K 39/39558 (2019.02); C12N 2510/00 (2019.02); C07K 2317/56 (2019.02)

(21) (22) Заявка: 2016138422, 06.03.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
06.03.2015

Дата регистрации:  
18.04.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
06.03.2014 GB 1403972.1

(43) Дата публикации заявки: 06.04.2018 Бюл. № 10

(45) Опубликовано: 18.04.2019 Бюл. № 11

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 06.10.2016

(86) Заявка РСТ:  
GB 2015/050649 (06.03.2015)

(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2015/132604 (11.09.2015)

Адрес для переписки:  
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО  
"Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ПЮЛЕ Мартен (GB),  
АНДЕРСОН Джон (GB),  
ТОМАС Саймон (GB)

(73) Патентообладатель(и):

ЮСиЭл БИЗНЕС ПиЭлСи (GB)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: WO 2013/040371 A2, 21.03.2013. WO  
01/23573 A1, 05.04.2001. NAKAMURA K. et  
al., "Construction of humanized anti-ganglioside  
monoclonal antibodies with potent immune  
effector functions", Cancer Immunol.  
Immunother., 2001, 50: 275-284. CURRAN K.  
et al., "Chimeric Antigen Receptors for T Cell  
Immunotherapy: Current Understanding and  
Future (см. прод.)

## (54) ХИМЕРНЫЙ АНТИГЕННЫЙ РЕЦЕПТОР

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к иммунологии. Предложен химерный антигенный рецептор (CAR), который содержит дисialogанглиозид (GD2)-связывающий домен. Кроме того, представлены нуклеиновая кислота, кодирующая CAR по изобретению; вектор экспрессии; Т-клетки и способ получения Т-клетки. Также описаны фармацевтическая композиция, способ лечения злокачественной

опухоли и применение Т-клетки в получении лекарственного средства для лечения злокачественной опухоли. Предложенный CAR обеспечивает увеличенное продуцирование INF-γ, пролиферацию CAR-Т-клеток и уничтожение клеток нейробластомы по сравнению с CAR на основе антитела 14g2a. Данное изобретение может найти дальнейшее применение в терапии. 9 н. и 17 з.п. ф-лы, 15 ил., 10 пр.

(56) (продолжение):

Direction", Journal of gene medicine, 2012, 14(6): 405-415. US 2013/216528 A1, 22.08.2013. RU 2366664 C2, 10.09.2009. RU 2462476 C2, 27.09.2012.

R U 2 6 8 5 4 7 9 C 2

R U 2 6 8 5 4 7 9 C 2



(51) Int. Cl.

*C07K 14/725* (2006.01)*C07K 19/00* (2006.01)*C07K 16/30* (2006.01)*C12N 5/0783* (2010.01)*C12N 15/13* (2006.01)*C12N 15/63* (2006.01)*A61K 35/17* (2015.01)*A61K 47/66* (2017.01)*A61K 47/68* (2017.01)*A61K 47/69* (2017.01)*A61P 35/00* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*C07K 14/7051* (2019.02); *C07K 16/3084* (2019.02); *A61K 35/17* (2019.02); *A61K 39/39558* (2019.02); *C12N 2510/00* (2019.02); *C07K 2317/56* (2019.02)(21) (22) Application: **2016138422**, **06.03.2015**(24) Effective date for property rights:  
**06.03.2015**Registration date:  
**18.04.2019**

Priority:

(30) Convention priority:  
**06.03.2014 GB 1403972.1**(43) Application published: **06.04.2018** Bull. № 10(45) Date of publication: **18.04.2019** Bull. № 11(85) Commencement of national phase: **06.10.2016**(86) PCT application:  
**GB 2015/050649** (06.03.2015)(87) PCT publication:  
**WO 2015/132604** (11.09.2015)Mail address:  
**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO  
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**PULE, Martin (GB),  
ANDERSON, John (GB),  
THOMAS, Simon (GB)**

(73) Proprietor(s):

**UCL BUSINESS PLC (GB)****(54) CHIMERIC ANTIGENIC RECEPTOR**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: present invention relates to immunology. Disclosed is a chimeric antigenic receptor (CAR), which contains a disialohanglioside (GD2)-binding domain. Also disclosed is a nucleic acid encoding a CAR of the invention; an expression vector; T-cells and a method for producing T-cells. There are also described a pharmaceutical composition, a method of treating a malignant tumour and use of T-cell in

preparing a drug for treating a malignant tumour. Disclosed CAR provides increased production of INF- $\gamma$ , proliferation of CAR-T-cells and destruction of neuroblastoma cells in comparison with CAR on the basis of antibody 14g2a.

EFFECT: this invention may find further application in therapy.

26 cl, 15 dwg, 10 ex

## ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к химерному антигенному рецептору (CAR), который связывает антиген злокачественной опухоли дисиаialogанглиозид (GD2). Т-клетки, экспрессирующие такой CAR, можно использовать в лечении злокачественных заболеваний, таких как нейробластома.

## ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Дисиаialogанглиозид (GD2, PubChem: 6450346) представляет собой гликофинголипид, содержащий сиаловую кислоту, экспрессируемый в первую очередь на клеточной поверхности. Функция этого углеводного антигена понята не полностью; однако полагают, что он играет важную роль в прикреплении опухолевых клеток к белкам внеклеточного матрикса. GD2 плотно, гомогенно и почти повсеместно экспрессирован на нейробластоме. В нормальных тканях экспрессия GD2 главным образом ограничена меланоцитами кожи и миелиновой оболочкой периферических болевых волокон. В ЦНС GD2 по-видимому является эмбриональным антигеном, но находят его слабо экспрессированным в рассеянных олигодендроцитах и в задней доле гипофиза. Это делает GD2 хорошо подходящим для направленной противоопухолевой терапии.

Антитела к GD2 проходили экстенсивное тестирование в качестве терапии нейробластомы. В настоящее время в клинике используют два клона и их производные: клон 3F814 и 3F8. Другой клон 14.187 тестировали в качестве IgG3 мыши, после переключения изотипа на IgG2a (14g2a) и, наконец, после химеризации с IgG1 человека для того, чтобы формировать ch14.18. Это последнее антитело приводило к явному эффекту в рандомизированном исследовании: US Children's Oncology Group сообщила о III фазе рандомизированного исследования ch14:18 у детей с высоким риском нейробластомы, которые достигли радиологической ремиссии после начального лечения. У этих пациентов имело место 20% улучшение EFS в группе ch14:18 со средним последующим наблюдением 2,1 года. Важно, что для этих средств нейротоксичность, наиболее часто в виде нейропатии, вызывающей хроническую боль, и менее часто офтальмоплегия являются основной токсичностью, ограничивающей дозу.

Продолжается улучшение этих терапевтических mAb: описан IL-2, иммуноцитокин, полученный от ch14.18. Это является достаточно токсичным средством с некоторым эффектом, оказываемым на минимальное остаточное заболевание, но не на массивное поражение. Ch14.18 полностью гуманизировано и его Fc содержит мутации для того, чтобы ингибировать активацию комплемента. Эта гуманизированная версия Ch14.18 проходит клинические исследования, но доступны только очень ограниченные данные. Также описана гуманизация антитела 3F8. Хотя клинические данные о серотерапии GD2 обнадеживают, устойчивая полная ремиссия до сих пор ограничена и нет свидетельств клинически полезной роли антител, за исключением условий минимального заболевания.

Таким образом, существует потребность в усовершенствованных терапевтических подходах к лечению нейробластомы и других злокачественных опухолей, экспрессирующих GD2.

## Химерные антигенные рецепторы (CAR)

Химерные антигенные рецепторы представляют собой белки, которые в их обычном формате, объединяют специфичность моноклонального антитела (mAb) с эффекторной функцией Т-клетки. Их обычной формой является трансмембранный доменный белок I типа с антигенраспознающим аминоконцом, спейсером, трансмембранным доменом, все соединены в составной эндодоме, который передает сигналы выживаемости и активации Т-клетки (см. фиг. 1a).

Наиболее распространенной формой этих молекул являются слитные конструкции из одноцепочечных вариабельных фрагментов (scFv), полученных из моноклональных антител, которые распознают целевой антиген, слитых через спейсер и трансмембранный домен с сигнальным эндодоменом. Такие молекулы вызывают активацию Т-клетки в ответ на распознавание своей мишени с помощью scFv. Когда Т-клетки экспрессируют такой CAR, они распознают и уничтожают целевые клетки, которые экспрессируют целевой антиген. Разработано несколько CAR против опухолеассоциированных антигенов и в настоящее время подходы адоптивного переноса с использованием таких CAR-экспрессирующих Т-клеток проходят клинические исследования для лечения различных злокачественных опухолей.

Описаны химерные антигенные рецепторы против GD2, в которых антигенсвязывающий домен основан на scFv 14g2a (WO 2013/040371 и Yvon et al (2009, Clin Cancer Res 15:5852-5860)).

Показано, что Т-клетки человека, экспрессирующие 14g2a-CD28-OX40- $\zeta$  CAR, имеют некоторую противоопухолевую активность, но не способны полностью устранять заболевание (Yvon et al (2009) как выше).

Авторы настоящего изобретения пытались создать альтернативный GD2-нацеленный CAR с усовершенствованными свойствами.

#### ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фиг. 1 - Конструкция химерного антигенного рецептора (CAR).

(а) обобщенное устройство CAR: связывающий домен распознает антиген; спейсер поднимает связывающий домен над клеточной поверхностью; трансмембранный домен заякоривает белок в мембране и эндодомен передает сигналы. С (b) до (d): различные генерации и перестановки эндодоменов CAR: (b) начальные конструкции передавали ИТАМ сигналы только через эндодомен Fc $\epsilon$ R1- $\gamma$  или CD3 $\zeta$ , тогда как более поздние конструкции передавали дополнительный (c) один или (d) два костимуляторных сигналах в цис.

Фиг. 2 - сконструированные варианты CAR против GD2 (а) CAR против GD2 с использованием антитела KM666 мыши в качестве scFv со спейсером IgG1 человека и эндодоменом CD28-OX40- $\zeta$ ; (b) CAR против GD2 с использованием гуманизированного антитела huKM666 Nakamura в том же формате, что и (а); (c) тот же формат, что и (b), за исключением того, что Fc домен модифицируют для того, чтобы удалять мотивы распознавания Fc рецептора; (d) тот же формат, что и (c), за исключением того, что спейсер представляет собой шарнир IgG1 - стебель CD8; (e) то же, что и (c), за исключением того, что спейсер представляет собой только стебель CD8; (f) то же, что и (c), за исключением того, что спейсер представляет собой только шарнир IgG1.

Фиг. 3 - сравнение CAR на основе muKM666 и huKM666. (а) Экспрессия на Т-клетках периферической крови от 3 нормальных доноров; (b) средняя интенсивность флуоресценции этих графиков FACS, представленная в виде гистограммы; (c) анализ высвобождения хрома с использованием нетрансдуцированных, трансдуцированных muKM666 и huKM666 Т-клеток в качестве эффекторов против мишеней A204 (GD2-отрицательные) и LAN-1 (GD2-положительные); (d) продуцирование IL-2 после того же стимула; (e) продуцирование интерферона- $\gamma$  после того же стимула; и (f) кратность пролиферации после того же стимула.

Фиг. 4. (а) Ретровирусная конструкция, делающая возможной коэкспрессию маркерного гена CD34 и CAR 1:1; (b) проточный цитометрический анализ экспрессии CAR (метка HA) в сравнении с маркерным геном CD34; (c) анализ высвобождения хрома нетрансдуцированными Т-клетками и Т-клетками, трансдуцированными тремя

различными вариантами CAR против GD2-положительных мишеней (LAN-1) и GD2-отрицательных мишеней (A204); (d) высвобождение интерферона- $\gamma$ ; (e) высвобождение IL-2; и (f) пролиферация тех же мишеней и эффекторов.

Фиг. 5 - введение мутаций, нарушающих связывание FcR, в Fc спейсер (a) введенные мутации; (b) экспрессия CAR, как определяют посредством окрашивания против Fc: нетрансдуцированный, дикого типа и мутантный; (c) уничтожение GD2-отрицательных и GD2-положительных мишеней с использованием одного из нетрансдуцированных Т-клеток, Т-клеток с CAR против GD2 с Fc дикого типа и с мутантным Fc; (d) активация нетрансдуцированных Т-клеток, Т-клеток против GD2 с Fc дикого типа и с мутантным Fc с использованием клеточной линии ТНР-1, экспрессирующей FcR; высвобождение IL-1 $\beta$  клеточной линией ТНР-1 в ответ на нетрансдуцированные Т-клетки, Т-клетки с CAR с Fc дикого типа и мутантным Fc.

Фиг. 6 - оптимизация экспрессирующей кассеты

(a) картирование оптимизации, которую осуществляли в кассете: SAR или CHS4; (b) репрезентативная экспрессия CAR с различными модификациями с использованием открытой рамки считывания или дикого типа или с оптимизацией кодонов. SAR конструкция дает узкий пик экспрессии, который является тем, что желательно. (c) Гистограмма, представляющие эти данные FACS от 3 нормальных доноров.

Фиг. 7 - сравнение различных эндодоменов

Сравнивали три различных химерных антигенных рецептора. Все рецепторы состояли из huK666 scFv, Fc домена из IgG1, мутированного для того, чтобы снижать связывание FcR, и трансмембранного домена CD28. CAR «28tmZ» имеет эндодомен CD3 $\zeta$ ; «28Z» имеет составной эндодомен CD28-CD3 $\zeta$ ; «28OXZ» имеет составной эндодомен, состоящий из CD28, OX40 и CD3 $\zeta$ . Т-клетки периферической крови от нормальных доноров трансдуцировали этими конструкциями с использованием ретровирусных векторов схожих титров. Эти различные Т-клеточные линии сравнивали наряду с нетрансдуцированными Т-клетками в качестве контролей. Т-клетки стимулировали с использованием клеток A204 (клеточная линия рабдомиосаркомы, которая является GD2-отрицательной) и клеток LAN-1 (клеточная линия нейробластомы, которая является GD2-положительной). Пролиферация и высвобождение цитокинов показывают, что активность рецепторов представляет собой 28tmZ < 28Z < 28OXZ.

Фиг. 8 - коэкспрессия с геном самоубийства iCasp9

(a) Коэкспрессия iCasp9 с CAR против GD2 с использованием последовательности FMD-2A; (b) экспрессия CAR в NT Т-клетках, Т-клетках, трансдуцированных GD2CAR, и Т-клетках iCasp9-2A-GD2CAR отдельно и после лечения с использованием CID; (c) уничтожение GD2-положительных (LAN-1) и -отрицательных (A204) мишеней нетрансдуцированными Т-клетками, Т-клетками, трансдуцированными GD2CAR, и Т-клетками, трансдуцированными iCasp9-2A-GD2CAR, с лечением с использованием CID или без него. Усредненное для Т-клеток 5 нормальных доноров.

Фиг. 9 - коэкспрессия с геном самоубийства RQR8

(a) CARhuK666Fc совместно экспрессировали с геном самоубийства наподобие RQR8 в ретровирусном векторе. (b) Т-клетки трансдуцировали этим ретровирусным вектором и определяли коэкспрессию CAR и RQR8 посредством окрашивания трансдуцированных Т-клеток поликлональным антителом против Fc и моноклональным антителом QBend10. (c) CAR положительную популяцию в этих Т-клетках можно истощать в присутствии ритуксимаба и комплемента. (d) Т-клетки, истощенные с использованием ритуксимаба, более не распознавали экспрессирующие GD2 мишени.

Фиг. 10 - (a) Бицистронный вектор, экспрессирующий GM3-синтазу и GD2-синтазу.

(b) Клетки SupT1, трансдуцированные этим вектором, становились GD2-положительными (нетрансдуцированный незакрашенный график; трансдуцированный закрашенный график).

Фиг. 11 - Кривые роста отдельных опухолей у мышей в следующих когортах: верхняя левая: мыши с GD2-экспрессирующими опухолями CT26, получающие спленоциты с CAR против GD2; верхняя правая: GD2-экспрессирующие опухоли CT26, получающие трансдуцированные имитатором спленоциты; нижняя левая: GD2-отрицательные опухоли CT26 (дикого типа) со спленоцитами с CAR против GD2; нижняя правая: GD2-экспрессирующие опухоли CT26, не получающие спленоциты

Фиг. 12 - Аминокислотные последовательности

A. CAR против GD2 представлен как (a) на фиг. 2 (muKM666-HCH2CH3-CD28OXZ - SEQ ID № 26)

B. CAR против GD2 представлен как (b) на фиг. 2 (huKM666-HCH2CH3-CD28OXZ - SEQ ID № 27)

C. CAR против GD2 представлен как (c) на фиг. 2 (huKM666-HCH2CH3pvaa-CD28OXZ - SEQ ID № 28)

D. CAR против GD2 представлен как (d) на фиг. 2 (huKM666-HSTK-CD28OXZ - SEQ ID № 29)

E. CAR против GD2 представлен как (e) на фиг. 2 (huKM666-STK-CD28XOXZ - SEQ ID № 30)

F. CAR против GD2 представлен как (f) на фиг. 2 (huKM666-HNG-CD28OXZ - SEQ ID № 31)

G. CAR против GD2 как показано в (c) фиг. 2, но с эндодоменом первой генерации (huKM666-HCH2CH3pvaa-CD28tmZ - SEQ ID № 32)

H. CAR против GD2 как показано в (c) фиг. 2, но с эндодоменом второй генерации (huMK666-HCH2CH3pvaa-CD28Z - SEQ ID № 33)

I. CAR против GD2, совместно экспрессированный с геном самоубийства iCasp9 - SEQ ID № 34

J. CAR против GD2, совместно экспрессированный с геном самоубийства RQR8 - SEQ ID № 35

Фиг. 13 - Структура GD2

Фиг. 14 - Сравнение CAR huK666 и 14g2a. (a) Карты протестированных конструкций: две конструкции тестировали в первичных Т-клетках. Обе представляют собой ретровирусные векторы, кодирующие RQR8 и GD2 CAR второй генерации, совместно экспрессированные с FMD-2A-подобной последовательностью. Единственное различие между конструкциями состоит в том, что в одной scFv представляет собой huK666 и в другой он представляет собой 14g2a. Т-клетки, трансдуцированные этими конструкциями, стимулировали 1:1 с использованием или A204 (GD2-отрицательная клеточная линия рабдомиосаркомы), и LAN-1 (GD2-положительная клеточная линия). (b) Через 24 часа в супернатанте измеряли интерферон-γ. huK666 CAR Т-клетки продуцируют больше интерферона-γ. (c) После одной недели подсчитывали Т-клетки, huK666 демонстрируют более высокую пролиферацию.

Фиг. 15 - Проточный цитометрический анализ совместной культуры между вторыми генерациями CAR на основе huK666 или 14g2a и клеточной линией нейробластомы LAN1. (a) Постановка эксперимента. После одной недели совместного культивирования клетки собирали и анализировали с помощью проточной цитометрии. Экспрессия CD45 позволяла различать лимфоидные клетки и нелимфоидные клетки с CD45- клетками, являющимися клетками LAN-1. Дополнительное окрашивание с использованием CD3/

QBEND/10 делало возможным подсчет CAR Т-клеток. (b) Только Т-клетки; (c) NT Т-клетки и клетки LAN-1; (d) Т-клетки с huK666-28-Z CAR и клетки LAN-1; (e) Т-клетки с 14g2a-28-Z CAR и клетки LAN-1. Остаток клеток LAN-1 наблюдали в совместной культуре с Т-клетками 14g2a CAR.

## 5 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ АСПЕКТОВ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы настоящего изобретения сконструировали новый химерный антигенный рецептор (CAR), направленный на GD2, который содержит GD2-связывающий домен на основании антитела K666.

- 10 Антитело к GD2 14g2a можно рассматривать в качестве золотого стандарта, поскольку его используют в качестве терапевтического антитела и оно представляет собой единственный scFv, тестированный до настоящего времени в исследовании CAR (PMID: 18978797). Авторы настоящего изобретения сравнивали CAR на основе 14g2a и huK666 в формате второй генерации, поскольку он является наиболее широко используемым форматом CAR, который используют в клинических исследованиях.
- 15 Авторы изобретения обнаружили, что Т-клетки с huK666 CAR высвобождают больше IFN- $\gamma$ , лучше пролиферируют и более полно уничтожают, чем 14g2a эквиваленты.

Таким образом, в первом аспекте настоящее изобретение относится к химерному антигенному рецептору (CAR), который содержит дисиаialogанглиозид (GD2)-связывающий домен, который содержит

- 20 а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит определяющие комплементарность области (CDR) со следующими последовательностями:

CDR1 - SYNIH (SEQ ID № 1);

CDR2 - VIWAGGSTNYNSALMS (SEQ ID № 2)

CDR3 - RSDDYSWFAY (SEQ ID № 3); и

- 25 б) вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит CDR со следующими последовательностями:

CDR1 - RASSSVSSSYLH (SEQ ID № 4);

CDR2 - STSNLAS (SEQ ID № 5)

CDR3 - QQYSGYPIT (SEQ ID № 6).

- 30 GD2-связывающий домен может содержать VH домен, который имеет последовательность, которая представлена в виде SEQ ID № 9 или SEQ ID № 10; или VL домен, который имеет последовательность, которая представлена в виде SEQ ID № 11 или SEQ ID № 12, или ее вариант, обладающий по меньшей мере 90% идентичностью последовательностей, который сохраняет способность i) связывать GD2 и ii) индуцировать передачу Т-клеточных сигналов.

GD2-связывающий домен может содержать последовательность, которая представлена в виде SEQ ID № 7 или SEQ ID № 8 или ее вариант, обладающий по меньшей мере 90% идентичностью последовательностей, который сохраняет способность i) связывать GD2 и ii) индуцировать передачу Т-клеточных сигналов.

- 40 Трансмембранный домен может содержать последовательность, которая представлена в виде SEQ ID № 13, или ее вариант, обладающий по меньшей мере 90% идентичностью последовательностей, который сохраняет способность i) связывать GD2 и ii) индуцировать передачу Т-клеточных сигналов.

- 45 GD2-связывающий домен и трансмембранный домен можно соединять с помощью спейсера.

Спейсер может содержать одно из следующего: Fc домен IgG1 человека; шарнир IgG1; шарнир IgG1-стебель CD8; или стебель CD8.

Спейсер может содержать шарнир IgG1-стебель CD8 или стебель CD8.



Спейсер может содержать Fc домен IgG1 или его вариант.

Спейсер может содержать Fc домен IgG1, который содержит последовательность, которая представлена в виде SEQ ID № 23 или SEQ ID № 24, или ее вариант, который обладает по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей.

5 CAR может содержать или быть ассоциированным с внутриклеточным доменом передачи Т-клеточных сигналов.

Внутриклеточный домен передачи Т-клеточных сигналов может содержать один или несколько из следующих эндодоменов: эндодомен CD28; эндодомен OX40 и CD3-ζ.

10 Внутриклеточный домен передачи Т-клеточных сигналов может содержать все из следующих эндодоменов: эндодомен CD28; эндодомен OX40 и CD3-ζ.

CAR может содержать последовательность, представленную в виде любой из SEQ ID № с 26 до 35 или ее варианта, который обладает по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей, но сохраняет способность i) связывать GD2 и ii) индуцировать  
15 передачу Т-клеточных сигналов.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует CAR согласно первому аспекту изобретения.

Последовательность нуклеиновой кислоты может иметь оптимизированные кодоны.

20 Последовательность нуклеиновой кислоты может содержать последовательность, которая представлена в виде SEQ ID № 25 или ее вариант, обладающий по меньшей мере 90% идентичностью последовательностей.

Нуклеиновая кислота также может кодировать ген самоубийства.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к вектору, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно второму аспекту изобретения.

25 В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к клетке, которая экспрессирует CAR согласно первому аспекту изобретения. Клетка может представлять собой цитолитическую клетку иммунной системы, такую как Т-клетка или естественная киллерная (NK) клетка.

30 Клетка может совместно экспрессировать CAR согласно первому аспекту изобретения и ген самоубийства.

Ген самоубийства может представлять собой, например, iCasp9 или RQR8.

В пятом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения клетки согласно четвертому аспекту изобретения, который включает стадию введения нуклеиновой кислоты согласно второму аспекту изобретения в клетку.

35 В шестом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, которая содержит вектор согласно третьему аспекту изобретения или клетку согласно второму аспекту изобретения вместе с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или эксципиентом.

40 В седьмом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли, который включает стадию введения вектора согласно третьему аспекту изобретения или клетки согласно четвертому аспекту изобретения субъекту.

Злокачественная опухоль может представлять собой нейробластому.

45 В восьмом аспекте настоящее изобретение относится к вектору согласно третьему аспекту изобретения или клетке согласно четвертому аспекту изобретения для применения в лечении злокачественной опухоли.

В девятом аспекте настоящее изобретение относится к применению согласно третьему аспекту изобретения или клетке согласно четвертому аспекту изобретения в получении

лекарственного средства для лечения злокачественной опухоли.

В десятом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения GD2-экспрессирующей клетки, который включает стадию введения нуклеиновой кислоты, кодирующей GM3-синтазу, и нуклеиновой кислоты, кодирующей GD2-синтазу, в клетку.

5 В одиннадцатом аспекте настоящее изобретение относится к GD2-экспрессирующей клетке, которая содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую GM3-синтазу, и гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую GD2-синтазу.

В двенадцатом аспекте настоящее изобретение относится к способу стимуляции клетки согласно четвертому аспекту изобретения *in vitro*, который включает стадию  
10 приведения клетки в контакт с GD2-экспрессирующей клеткой согласно одиннадцатому аспекту изобретения.

В тринадцатом аспекте настоящее изобретение относится к экспрессирующей кассете, которая экспрессирует CAR, который содержит область прикрепления каркаса (SAR).

Экспрессирующая кассета может экспрессировать CAR согласно первому аспекту  
15 изобретения.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

### ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ (CAR)

Химерные антигенные рецепторы (CAR), также известные как химерные Т-клеточные рецепторы, искусственные Т-клеточные рецепторы и химерные иммунорецепторы,  
20 представляют собой сконструированные рецепторы, которые придают произвольную специфичность иммунной эффекторной клетке. В классическом CAR специфичность моноклонального антитела придают Т-клетке. CAR-кодирующие нуклеиновые кислоты можно переносить на Т-клетки, например, с использованием ретровирусных векторов. Таким образом, можно генерировать большое число Т-клеток со специфичностью к  
25 злокачественным опухолям для адоптивного переноса клеток. В I фазе клинических исследований этого подхода продемонстрирован эффект.

Связывающий целевой антиген домен в CAR обычно сливают через спейсер и трансмембранный домен с сигнальным эндодоменом. Когда CAR связывает целевой антиген, это ведет к передаче активирующего сигнала на Т-клетку, которая его  
30 экспрессирует.

CAR по настоящему изобретению содержит GD2-связывающий домен, который основан на моноклональном антителе KM666 (Nakamura et al (2001) Cancer Immunol. Immunother. 50:275-284).

CAR по настоящему изобретению содержит GD2-связывающий домен, который  
35 содержит

а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую определяющие комплементарность области (CDR) со следующими последовательностями:

CDR1 - SYNIH (SEQ ID № 1);

CDR2 - VIWAGGSTNYNSALMS (SEQ ID № 2)

40 CDR3 - RSDDYSWFAY (SEQ ID № 3); и

б) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую CDR со следующими последовательностями:

CDR1 - RASSSVSSSYLH (SEQ ID № 4);

CDR2 - STSNLAS (SEQ ID № 5)

45 CDR3 - QQYSGYPIT (SEQ ID № 6).

Может быть возможно вводить одну или несколько мутаций (замен, добавлений или делеций) в или каждый CDR, не оказывая отрицательного влияния на GD2-связывающую активность. Каждый CDR, например, может иметь одну, две или три аминокислотных

мутации.

CAR по настоящему изобретению может содержать одну из следующих аминокислотных последовательностей:

SEQ ID № 7 (последовательность KM666 мыши)

5 QVQLKESGPVLVAPSQTLSITCTVSGFSLASYNHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGST  
NYSALMSRLSISKDNSKSQVFLQMNSLQDDTAMYYCAKRSDDYSWFAYWGQGTIV  
TVSASGGGGSGGGSGGGGSENVLTQSPAISASPGKVTMTCRASSSVSSSYLHWYQ  
QKSGASPKVWIYSTSNLASGVPRFSGSGSGTSYSLTISSVEAEDAATYYCQQYSGYPITF  
FGAGTKVEVKR

10 SEQ ID № 8 (последовательность гуманизированного KM666)

QVQLQESGPGVLKPSQTLSITCTVSGFSLASYNHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGST  
NYSALMSRLTISKDNSKNQVFLKMSSLTAAADTAVYYCAKRSDDYSWFAYWGQGTIV  
TVSSGGGGSGGGSGGGGSENVLTQSPAISASPGKVTMTCRASSSVSSSYLHWYQQ  
KSGKAPKVWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYSGYPITF  
15 GQGTKVEIKR

CAR по настоящему изобретению может содержать одну из следующих последовательностей VH:

SEQ ID № 9 (последовательность VH из KM666 мыши)

20 QVQLKESGPVLVAPSQTLSITCTVSGFSLASYNHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGST  
NYSALMSRLSISKDNSKSQVFLQMNSLQDDTAMYYCAKRSDDYSWFAYWGQGTIV  
TVSA

SEQ ID № 10 (последовательность VH гуманизированного KM666)

QVQLQESGPGVLKPSQTLSITCTVSGFSLASYNHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGST  
NYSALMSRLTISKDNSKNQVFLKMSSLTAAADTAVYYCAKRSDDYSWFAYWGQGTIV  
25 TVSS

CAR по настоящему изобретению может содержать одну из следующих последовательностей VL:

SEQ ID № 11 (последовательность VL из KM666 мыши)

30 ENVLTQSPAISASPGKVTMTCRASSSVSSSYLHWYQQKSGASPKVWIYSTSNLAS  
GVPRFSGSGSGTSYSLTISSVEAEDAATYYCQQYSGYPITFGAGTKVEVK

SEQ ID № 12 (последовательность VH гуманизированного KM666)

ENVLTQSPAISASPGKVTMTCRASSSVSSSYLHWYQQKSGKAPKVWIYSTSNLA  
SGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYSGYPITFGQGTKVEIK

35 CAR по изобретению может содержать вариант последовательности, которая  
представлена в виде SEQ ID № 7, 8, 9, 10, 11 или 12, обладающий по меньшей мере 80,  
85, 90, 95, 98 или 99% идентичностью последовательностей, при условии, что вариант  
последовательности сохраняет способность связывать GD2 (когда в сочетании с  
комплементарным доменом VL или VH, если уместно).

40 Процентная доля идентичности между двумя полипептидными последовательностями  
можно легко определять с помощью программ, таких как BLAST, которая свободно  
доступна по адресу <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.

#### ТРАНСМЕМБРАННЫЙ ДОМЕН

45 CAR по изобретению также может содержать трансмембранный домен, который  
пронизывает мембрану. Он может содержать гидрофобную альфа-спираль. Из CD28  
можно извлекать трансмембранный домен, который дает хорошую стабильность  
рецептора.

Трансмембранный домен может содержать последовательность, которая  
представлена в виде SEQ ID № 13.

SEQ ID № 13  
FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIFWV  
ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ДОМЕН Т-КЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ  
(ЭНДОДОМЕН)

5 Эндодомен представляет собой часть CAR, которая передает сигнал. После распознавания антигена рецепторы образуют кластер и происходит передача сигнала в клетку. Наиболее широко используемым эндодоменным компонентом является таковой из CD3-ζ, который содержит 3 ITAM. Это передает активационный сигнал в Т-клетку после связывания антигена. CD3-ζ может не предоставлять полностью  
10 компетентный активационный сигнал и может быть необходима передача дополнительного костимуляторного сигнала. Например, химерный CD28 и OX40 можно использовать с CD3-ζ для того, чтобы передавать пролиферативный сигнал/сигнал выживаемости или все три можно использовать вместе.

Эндодомен CAR по настоящему изобретению может содержать эндодомен CD28 и  
15 OX40 и CD3-ζ эндодомен.

Трансмембранный и внутриклеточный домен Т-клеточной сигнализации (эндодомен) в CAR по настоящему изобретению может содержать последовательность, которая представлена в виде SEQ ID № 14, 15, 16, 17 или 18, или ее вариант, обладающий по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей.

20 SEQ ID № 14 (эндодомен CD28)

RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAY

SEQ ID № 15 (эндодомен CD40)

RSRDQRLPPDANKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI

SEQ ID № 16 (эндодомен CD3ζ)

25 RSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKN  
PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL  
PPR

SEQ ID № 17 (CD28Z)

30 RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQ  
GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY  
SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID № 18 (CD28OXZ)

35 RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRDQRLPPDANKPPGG  
GSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR  
RGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS  
TATKDTYDALHMQALPPR

Вариант последовательности может иметь по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности последовательностей с SEQ ID № 13, 14, 15, 16, 17 или 18, при условии, что последовательность предусматривает эффективный трансмембранный  
40 домен/внутриклеточный домен Т-клеточной сигнализации.

### СИГНАЛЬНЫЙ ПЕПТИД

CAR по настоящему изобретению может содержать сигнальный пептид с тем, чтобы когда CAR экспрессируют внутри клетки, такой как Т-клетка, направлять синтезированный белок к эндоплазматическому ретикулуму и впоследствии к клеточной  
45 поверхности, где он будет экспрессирован.

Сердцевина сигнального пептида может содержать длинный участок из гидрофобных аминокислот, которые обладают склонностью к формированию одной альфа-спирали. Сигнальный пептид может начинаться коротким положительно заряженным участком

аминокислот, который помогает укрепить надлежащую топологию полипептида во время транслокации. В конце сигнального пептида типично имеет место участок из аминокислот, который распознает и расщепляет сигнальная пептидаза. Сигнальная пептидаза может расщеплять или во время или после завершения транслокации для того, чтобы создавать свободный сигнальный пептид и зрелый белок. Затем специфичные протеазы расщепляют свободные сигнальные пептиды.

Сигнальный пептид может находиться на аминоконце молекулы.

CAR по изобретению может иметь общую формулу:

Сигнальный пептид - GD2-связывающий домен - спейсерный домен -

трансмембранный домен - внутриклеточный домен Т-клеточной сигнализации.

Сигнальный пептид может содержать SEQ ID № 19 или ее вариант, который имеет 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотную мутацию (инсерции, замены или добавления) при условии, что сигнальный пептид все еще функционирует для того, чтобы обуславливать экспрессию CAR на клеточной поверхности.

SEQ ID № 19: METDTLLLVLLLWVPGSTG

Сигнальный пептид из SEQ ID № 19 является компактным и высоко эффективным. Предсказано, что он дает приблизительно 95% расщепление после конечного глицина, давая эффективное удаление с помощью сигнальной пептидазы.

СПЕЙСЕР

CAR по настоящему изобретению может содержать спейсерную последовательность для того, чтобы соединять GD2-связывающий домен с трансмембранным доменом и пространственно отделять GD2-связывающий домен от эндодомена. Гибкий спейсер позволяет ориентировать GD2-связывающий домен в различных направлениях, чтобы сделать возможным связывание GD2.

Спейсерная последовательность, например, может содержать Fc-область IgG1, шарнир IgG1 или стебель CD8 или их сочетание. Альтернативно спейсер может содержать альтернативную последовательность, которая имеет схожую длину и/или свойства разнесения доменов, как Fc-область IgG1, шарнир IgG1 или стебель CD8.

Спейсер из IgG1 человека можно изменять для того, чтобы удалять мотивы связывания Fc.

Примеры аминокислотных последовательностей для этих спейсеров приведены далее:

SEQ ID № 20 (шарнир-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> из IgG1 человека)

AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEV  
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP  
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN  
NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
KD

SEQ ID № 21 (стебель CD8 человека):

TTTPAPRPPTPARTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI

SEQ ID № 22 (шарнир IgG1 человека):

AEPKSPDKTHTCPPCPKDPK

SEQ ID № 23 (шарнир-Fc IgG1)

AEPKSPDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP  
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN  
NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
KDPK

SEQ ID № 24 (шарнир IgG1-Fc, модифицированный для того, чтобы удалять мотивы распознавания Fc рецептора)

AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVA\*GPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPE  
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL  
5 PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE  
NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG  
KKDPK

Модифицированные остатки подчеркнуты; \* обозначает делецию.

GD2

10 GD2 представляет собой дисialogанглиозид, экспрессируемый на опухолях нейроэктодермального происхождения, включая нейробластому и меланому человека, при этом экспрессия на нормальных тканях крайне ограничена, у человека главным образом мозжечком и периферическими нервами.

Относительно опухолеспецифичная экспрессия GD2 делает его подходящей мишенью  
15 для иммунотерапии.

### ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Второй аспект изобретения относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует CAR по первому аспекту изобретения.

Последовательность нуклеиновой кислоты может быть способна кодировать CAR,  
20 который имеет аминокислотную последовательность, представленную в виде любой из SEQ ID №№ 26-35.

Последовательность нуклеиновой кислоты может представлять собой или содержать следующую последовательность:

25 SEQ ID № 25 ДНК последовательность ретровирусной кассеты, содержащей CAR против GD2, совместно экспрессированный с геном самоубийства RQR8 с рамкой с оптимизированными кодонами и областью SAR для усиления экспрессии

30

35

40

45

1 tgaagaccc cacctgtagg ttggcaagc tagcttaagt aacgccattt tgcaaggcat ggaaaaatac  
 >>.....LTR.....>

71 ataactgaga atagaaaagt tcagatcaag gtcaggaaca gatggaacag ctgaatatgg gccaaacagg  
 >.....LTR.....>

5 141 atatctgttg taagcagttc ctgccccggc tcagggccaa gaacagatgg aacagctgaa tatgggccaa  
 >.....LTR.....>

211 acaggataatc tgtggtaagc agttcctgcc ccggctcagg gccagaaca gatgggtccc agatgcggtc  
 >.....LTR.....>

10 281 cagccctcag cagtttctag agaaccatca gatgtttcca ggggtcccca aggacctgaa atgacctgt  
 >.....LTR.....>

351 gccttatttg aactaaccaa tcagttcget tctcgttctt gttcgcgcgc ttatgctccc cgagctcaat  
 >.....LTR.....>

421 aaaagagccc acaacccctc actcggggcg ccagtcctcc gattgactga gtgcgccggg tacccgtgta  
 >.....LTR.....>

15 491 tccaataaac cctcttgag ttgcatcga cttgtgtgtc cgtgtttcct tgggagggtc tctctgagt  
 >.....LTR.....>

561 gattgactac ccgtcagcgg gggcttttca ttgggggct cgtccgggat cgggagaccc ctgccaggg  
 >.....LTR.....>

631 accacggacc caccaccggg aggtaagctg gccagcaact tatctgtgtc tgtccgattg tctagtgtct

701 atgactgatt ttatgcgcct gcgtcggtag tagttagcta actagctctg tatctggcgg acccgtgggtg

20 Eco52I  
 -----  
 771 gaactgacga gttcgggaaca cccggccgca accctgggag acgtcccagg gacttcgggg gccgtttttg

PshAI  
 -----  
 841 tggcccgacc tgagtctaa aatcccgatc gtttaggact ctttgggtga ccccccttag aggagggata

25 911 tgtggttctg gtaggagacg agaacctaaa acagttcccg cctccgtctg aatttttget ttcggttttg

981 gaccgaagcc gcgcgcgcgc tcttgtctgc tgcagcatcg ttctgtgttg tctctgtctg actgtgttct

30 SrfI  
 -----  
 1051 tgtatattgtc tgaatatatg ggcccgggct agcctgttac cactccctta agtttgacct taggtcactg

1121 gaaagatgtc gagcggatcg ctcaacaaca gtccgtagat gtcaagaaga gacgttgggg taccttctgc

1191 tctgcagaat ggccaacctt taacgtcga tggccgcgag acggcacctt taaccgagac ctcacaccc

1261 aggttaagat caaggtcttt tcacctggcc cgcattgaca ccagaccag gtgggtgaca tctgtacctg

35 1331 ggaagccttg gcttttgacc cccctccctg ggtcaagccc ttgttacacc ctaagcctcc gcctcctctt

1401 cctccatccg ccccgctctc ccccttgaa cctcctcgtt cgaccccgcc tcatcctcc ctttatccag

BglII  
 -----  
 1471 ccctcactcc ttctctagcg gccccatat ggccatatga gatcttatat ggggcacccc cgcccttgt

40 1541 aaacttcctt gacctgaca tgacaagagt tactaacagc ccctctctcc aagctcactt acaggctctc

AgeI  
 -----  
 1611 tacttagtcc agcacgaagt ctggagacct ctggcggcag cctaccaaga acaactggac cgaccggtgg

1681 tacctcacc ttaccgagtc ggcgacacag tgtgggtccg ccgacaccag actaagaacc tagaacctcg

45

AccI

-----

1751 ctggaagga ccttacacag tctgtgtgac caccaccacc gccctcaaag tagacggcat cgcagcttgg

PmlI

-----

1821 atacacgccg cccacgtgaa ggctgccgac cccgggggtg gaccatcctc tagactgcc aatggggcac  
 >>.orf.>  
 >>RQR8.>

1891 cagcctgtgt tgetggatgg cctgtgtcct gctggggccc gaccacgccg atgcctgccc ctacagcaac  
 >.....orf.....>  
 >.....RQR8.....>

1961 cccagcctgt gcagcggagg cggcggcagc gagctgcccc cccagggcac cttctccaac gtgtccacca  
 >.....orf.....>  
 >.....RQR8.....>

2031 acgtgagccc agccaagccc accaccaccg cctgtcctta ttccaatcct tccctgtgta ggggaggggg  
 >.....orf.....>  
 >.....RQR8.....>

2101 aggcagcccc gccccagac ctccaccacc agccccacc atcgccagcc agcctctgag cctgagcccc  
 >.....orf.....>  
 >.....RQR8.....>

SgrAI

-----

2171 gaggcctgcc gccacgccgc cggcggcgcc gtgcacacca gaggcctgga ttgcgctgc gatatttaca  
 >.....orf.....>  
 >.....RQR8.....>

BclI

-----

2241 tctgggcccc actggcgggc acctgtggcg tctgtgtgtg gagcctggtg atcacctgt actgcaacca  
 >.....orf.....>  
 >.....RQR8.....>

2311 ccgaaccgc aggcgcgtgt gcaagtgcc caggcccggt gtgagagccg aggcagagg cagcctgtgt  
 >.....orf.....>  
 >.....RQR8.....>>  
 >>.....FMD-2A.....>

NcoI

-----

2381 acctgcggcg acctggagga gaaccaggc cccatggaga ccgacaccct gctgtgtgtg gtgtgtgtgc  
 >.....orf.....>  
 >.....FMD-2A.....>>  
 >>.....CAR.....>

2451 tgtgggtgcc aggcagcacc ggccagggtc agctgcagga gtctggcccc gccctggtga agccagcca  
 >.....orf.....>  
 >.....CAR.....>

2521 gaccctgagc atcacctgca ccgtgagcgg ctacagcctg gccagctaca acatccactg ggtgcggcag  
 >.....orf.....>  
 >.....CAR.....>

2591 cccccaggea agggcctgga gtggtgtggc gtgatctggg ctggcggcag caccaactac aacagcgccc  
 >.....orf.....>  
 >.....CAR.....>

2661 tgatgagccg gctgaccatc agcaaggaca acagcaagaa ccaggtgttc ctgaagatga gcagcctgac  
 >.....orf.....>  
 >.....CAR.....>

2731 agccgccgac accgcctgtg actactgcgc caagcggagc gacgactaca gctgggttcg ctactggggc  
 >.....orf.....>  
 >.....CAR.....>



2801 caggggcaccc tggtagccgt gagctctggc ggaggcggct ctggcggagg cggctctggc ggaggcggca  
 >.....orf.....>  
 >.....CAR.....>

2871 gcgagaacca gatgaccag agccccagca gcttgagcgc cagcgtgggc gaccgggtga ccatgacctg  
 >.....orf.....>  
 >.....CAR.....>

2941 cagagccagc agcagcgtga gcagcagcta cctgcactgg taccagcaga agagcggcaa ggccccaaag  
 >.....orf.....>  
 >.....CAR.....>

3011 gtgtggatct acagcaccag caacctggcc agcggcgtgc ccagccggtt cagcggcagc ggcagcggca  
 >.....orf.....>  
 >.....CAR.....>

3081 ccgactacac cctgaccatc agcagcctgc agcccgagga ctctgccacc tactactgcc agcagtacag  
 >.....orf.....>  
 >.....CAR.....>

3151 cggtacccc atcaccttgc gccagggcac caaggtggag atcaagcggc cggatccgcg cagagccaaa  
 >.....orf.....>  
 >.....CAR.....>

3221 tctcctgaca aaactcacac atgccaccg tgcccagcac ctcccgtggc cggcccgtca gtcttcctct  
 >.....orf.....>  
 >.....CAR.....>

3291 tccccccaaa acccaaggac accctcatga tcgcccggac ccttgaggtc acatgcgtgg tggtagcgt  
 >.....orf.....>  
 >.....CAR.....>

3361 gagccaagaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gaaggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca  
 >.....orf.....>  
 >.....CAR.....>

3431 aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact  
 >.....orf.....>  
 >.....CAR.....>

3501 ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat  
 >.....orf.....>  
 >.....CAR.....>

3571 ctccaaagcc aaagggcagc ccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc  
 >.....orf.....>  
 >.....CAR.....>

3641 aagaaccagg tcagcctgac ctgctgggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga  
 >.....orf.....>  
 >.....CAR.....>

3711 gcaatgggca accggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct cctttctct  
 >.....orf.....>  
 >.....CAR.....>

3781 ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat  
 >.....orf.....>  
 >.....CAR.....>

3851 gaggcctgc acaatcacta taccagaaa tctctgagtc tgagcccagg caagaaggac cccaagttct  
 >.....orf.....>

```

>.....CAR.....>
3921 gggctcctggg ggtgggtggga ggcggtgctgg cctgttactc tctcctgggtg acggtggcct tcateatctt
>.....orf.....>
>.....CAR.....>
5 3991 ctgggtgogc tccaagagga gcaggtcctt gcacagtgcac tacatgaaca tgaactccccg ccgccccggg
>.....orf.....>
>.....CAR.....>
4061 ccaccccgca agcattacca gccctatgcc ccaccacgag acttcgcagc ctatcgctcc cgggtgaagt
>.....orf.....>
>.....CAR.....>
10 4131 tctctcgctc tgccgatgcc ccagcctatc agcagggcca gaatcagctg tacaatgaac tgaacctggg
>.....orf.....>
>.....CAR.....>
4201 caggcgggag gagtacgacg tgctggataa gccgagaggg agagaccccc agatggggcg caaaccacgg
>.....orf.....>
>.....CAR.....>
15 4271 cgcaaaaatc ccagggaggg actctataac gagctgcaga aggacaaaat gcccgaggcc tattccgaga
>.....orf.....>
>.....CAR.....>
4341 tcggcatgaa gggagagaga agacgcggaa agggccacga cggcctgtat cagggtattgt ccaccgctac
>.....orf.....>
>.....CAR.....>
20                                     MluI   ClaI
                                     -----
4411 aaaagataca tatgatgcc tgcacatgca gccctgccca ccagatgac gcgtatcgat actgtttctca
>.....orf.....>>
>.....CAR.....>>
>>..SAR..>
4481 tcacatcata tcaaggttat ataccatcaa tattgccaca gatgttactt agccttttaa tattttctca
>.....SAR.....>
25 4551 atttagtgta tatgcaatga tagttctctg attttctgaga ttgagtttct catgtgtaat gattatttag
>.....SAR.....>
4621 agtttctctt tcctctgttc aaatttttgt ctagttttat tttttactga tttgtaagac ttctttttat
>.....SAR.....>
30 4691 aatctgcata ttacaattct ctttactggg gtgttgcaaa tattttctgt cattctatgg cctgaotttt
>.....SAR.....>
4761 cttaatgggt ttttaatttt aaaaataagt cttaatatct atgcaatcta attaacaatc ttttctttgt
>.....SAR.....>
                                     SphI
                                     -----
35 4831 ggtaggact ttgagtcata agaaattttt ctctacactg aagtcatgat gccatgcttc tatattattt
>.....SAR.....>
4901 tctaaaagat ttaaagtttt gccttctcca tttagactta taattcactg gaattttttt gtgtgtatgg
>.....SAR.....>
4971 tatgacatat gggttccctt ttatttttta catataaata tatttccctg tttttctaaa aaagaaaaag
>.....SAR.....>
40 5041 atcatcattt tccattgta aaatgccata tttttttcat aggtcactta catatatcaa tgggtctgtt
>.....SAR.....>
5111 tctgagctct actctatttt atcagcctca ctgtctatcc ccacacatct catgctttgc tctaaatctt
>.....SAR.....>
5181 gatatttagt ggaacattct tccattttt gttctacaag aatatttttg ttattgtctt tgggctttct
>.....SAR.....>
45 5251 atatacattt tgaaatgagg ttgacaagtt cggattagtc caatttgta aagacaggat atcagtggtc
>.....SAR.....>>
5321 caggctctag ttttgactca acaatatcac cagctgaagc ctatagagta cgagccatag ataaaataaa

```

```

5391 agatttttatt tagtctccag aaaaaggggg gaatgaaaga cccacactgt aggtttggca agctagctta
    >>.....LTR.....>
5461 agtaacgcca ttttgcaagg catggaaaaa tacataactg agaatagaga agttcagatc aaggtcagga
    >.....LTR.....>
5531 acagatggaa cagctgaata tgggccaac aggatatctg tggtaagcag ttcctgcccc ggctcagggc
    >.....LTR.....>
5601 caagaacaga tggaacagct gaatatgggc caaacaggat atctgtggta agcagttcct gccccggctc
    >.....LTR.....>
5671 agggccaaga acagatgggc cccagatgcg gtccagccct cagcagtttc tagagaacca tcagatgttt
    >.....LTR.....>
5741 ccaggggtgcc ccaaggacct gaaatgacct tgtgccttat ttgaactaac caatcagttc gcttctcget
    >.....LTR.....>

5811 tctgttcgcg cgtttctgct ccccgagctc aataaaagag cccacaacct ctcaactcggg gcgccagttc
    >.....LTR.....>
5881 tccgattgac tgagtcgccc gggtaaccgt gtatccaata aaccctcttg cagttgcac cgaattgtgg
    >.....LTR.....>
5951 tctcgtgtgt ccttgggagg gtctcctctg agtgattgac taccgctcag cgggggtctt tcac
    >.....LTR.....>>

```

Последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать ту же аминокислотную последовательность, которую кодирует SEQ ID № 25, но может иметь другую последовательность нуклеиновой кислоты, из-за вырожденности генетического кода. Последовательность нуклеиновой кислоты может обладать по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентичностью с последовательностью, которая представлена в виде SEQ ID № 25, при условии, что она кодирует CAR, как определено в первом аспекте изобретения.

### ГЕНЫ САМОУБИЙСТВА

Поскольку Т-клетки являются пересаженными и автономными, средство избирательного удаления CAR Т-клеток у реципиентов Т-клеток с CAR против GD2 является желаемым. Гены самоубийства представляют собой генетически кодируемые механизмы, которые ведут к избирательному разрушению инфузированных Т-клеток в присутствии приемлемой токсичности. Самым ранним клиническим опытом с генами самоубийства является тимидинкиназа вируса герпеса (HSV-TK), которая делает Т-клетки восприимчивыми к ганцикловиру. HSV-TK представляет собой высокоэффективный ген самоубийства. Однако предварительно сформированный иммунный ответ может ограничивать ее использование в клинической ситуации существенной иммуносупрессии, такой как трансплантация гаплоидентичных стволовых клеток. Индуцибельная каспаза 9 (iCasp9) представляет собой ген самоубийства, сконструированный посредством замены активирующего домена каспазы 9 на модифицированный FKBP12. iCasp9 активируют с помощью в остальном инертного низкомолекулярного химического индуктора димеризации (CID). iCasp9 в последнее время тестировали в ситуации гаплоидентичной HSCT, и он может останавливать GvHD. Наибольшим ограничением iCasp9 является зависимость от доступности проприетарного CID для клинического применения. Как iCasp9, так и HSV-TK представляют собой внутриклеточные белки, так что при использовании в качестве единственного трансгена, их следует экспрессировать совместно с маркерным геном для того, чтобы сделать возможным отбор трансдуцированных клеток.

iCasp9 может содержать последовательность, которая представлена в виде SEQ ID

№ 36 или ее вариант, обладающую по меньшей мере 80, 90, 95 или 98% идентичностью последовательностей.

SEQ ID № 36

MLEGVQVETISPGDGRTPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFFKFMLGKQ  
 5 EVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLESGGGS  
 GVDGFGDVGALSLRGNADLAYILSMEPCGHCLIINNPNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLR  
 RRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMLVALLLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPG  
 AVYGTGDCPVSVKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFVASTSPEDESP  
 GSNPEPDATPFQEGLRFTDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDD  
 10 IFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNLRKKLFFKTSAS

Авторы настоящего изобретения в последнее время описали новый маркер/ген самоубийства, известный как RQR8, который можно обнаруживать с использованием антитела QBEnd10 и экспрессирующих клеток, лизированных терапевтическим антителом ритуксимаб.

15 RQR8 может содержать последовательность, которая представлена в виде SEQ ID № 37 или ее варианта, обладающей по меньшей мере 80, 90, 95 или 98% идентичностью последовательностей.

SEQ ID № 37

MGTSLLCWMALCLLGADHADACPYSNPSLCSGGGGSELPTQGTFSNVSTNVSPAKP  
 20 TTTACPYSNPSLCSGGGGSPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC  
 DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVV

Ген самоубийства можно экспрессировать в виде одного полипептида с CAR, например, с использованием саморасщепляющегося пептида между двумя последовательностями.

25 ВЕКТОР

Настоящее изобретение также относится к вектору, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением. Такой вектор можно использовать для того, чтобы вводить последовательность нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина с тем, чтобы она экспрессировала и  
 30 продуцировала молекулу согласно первому аспекту изобретения.

Вектор, например, может представлять собой плазмиду или вирусный вектор, такой как ретровирусный вектор или лентивирусный вектор.

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

Вектор также может содержать последовательность нуклеиновой кислоты,  
 35 кодирующую ген самоубийства, такой как iCasp9 или RQR8.

КЛЕТКА-ХОЗЯИН

Изобретение также относится к клетке-хозяину, которая содержит нуклеиновую кислоту в соответствии с изобретением. Клетка-хозяин может быть способна экспрессировать CAR согласно первому аспекту изобретения.

40 Клетка-хозяин может представлять собой цитолитическую клетку иммунной системы, такую как Т-клетка или естественная киллерная (NK) клетка человека.

Т-клетку, способную экспрессировать CAR в соответствии с изобретением, можно создавать посредством трансдукции или трансфекции Т-клетки CAR-кодирующей нуклеиновой кислотой.

45 CAR Т-клетку можно создавать ex vivo. Т-клетка может быть из образца мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) от пациента или донора. Т-клетки можно активировать и/или размножать перед трансдукцией CAR-кодирующей нуклеиновой кислотой, например, посредством обработки моноклональным антителом

против CD3.

### ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей вектор или CAR-экспрессирующую Т-клетку по изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или эксципиентом и необязательно один или несколько дополнительных фармацевтически активных полипептидов и/или соединений. Такой состав может быть, например, в форме, подходящей для внутривенной инфузии).

### СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ

Т-клетки, экспрессирующие молекулу CAR по настоящему изобретению, способны уничтожать клетки злокачественной опухоли, такие как клетки нейробластомы. CAR-экспрессирующие Т-клетки можно создавать или *ex vivo* или из собственной периферической крови пациента (первая сторона) или в ситуации трансплантата гематопоезических стволовых клеток из периферической крови донора (вторая сторона) или из периферической крови от несвязанного донора (третья сторона). Альтернативно, CAR Т-клетки можно получать через дифференциацию индуцибельных клеток-предшественников или эмбриональных клеток-предшественников в Т-клетки *ex vivo*. В этих случаях CAR Т-клетки создают посредством введения ДНК или РНК, кодирующей CAR, с помощью одного из многих средств, включая трансдукцию вирусным вектором, трансфекцию ДНК или РНК.

Т-клетки, экспрессирующие молекулу CAR по настоящему изобретению, можно использовать для лечения злокачественного заболевания, в частности, злокачественного заболевания, связанного с экспрессией GD2.

Злокачественная опухоль может представлять собой эктодермальную опухоль.

Примеры злокачественных опухолей, которые коррелируют с повышенными уровнями экспрессии GD2, представляют собой: нейробластому, меланому, медуллобластому, саркомы мягких тканей, остеосаркому и мелкоклеточные злокачественные опухоли легких, такие как NSCLC.

Способ лечения заболевания относится к терапевтическому использованию вектора или Т-клетки по изобретению. В этом отношении, вектор или Т-клетку можно вводить субъекту, обладающему существующим заболеванием или состоянием для того, чтобы уменьшать, снижать или улучшать по меньшей мере один симптом, связанный с заболеванием, и/или замедлять, снижать или блокировать прогрессирование заболевания. Способ по изобретению может вызывать или ускорять опосредованное Т-клетками уничтожение GD2-экспрессирующих клеток, таких как клетки злокачественной опухоли.

### GD2-ЭКСПРЕССИРУЮЩАЯ КЛЕТКА

Изобретение также относится к способу получения GD2-экспрессирующей клетки, который включает стадию введения нуклеиновой кислоты, кодирующей GM3-синтазу, и нуклеиновой кислоты, кодирующей GD2-синтазу, в клетку.

Нуклеиновую кислоту можно вводить, например, посредством трансфекции или трансдукции, с использованием вектора, такого как плазмиды или вирусный вектор.

Изобретение также относится к GD2-экспрессирующей клетке, которая содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, которая кодирует GM3-синтазу, и гетерологичную нуклеиновую кислоту, которая кодирует GD2-синтазу.

Нуклеиновая кислота может быть «гетерологичной» в том смысле, что она обычно не присутствует в клетке. Она представляет собой искусственно введенную рекомбинантную последовательность нуклеиновой кислоты.

Клетка может быть из клеточной линии.

Клетку можно использовать для стимуляции GD2CAR T-клеток в культуре, таких как Т-клетки по настоящему изобретению.

Далее изобретение дополнительно описано в виде примеров, которые предназначены помогать специалисту в данной области при осуществлении изобретения и не предназначены для того, чтобы каким-либо образом ограничивать объем изобретения.

#### ПРИМЕРЫ

Пример 1 - Использование гуманизированного антитела huK666 в качестве связывающего средства

CAR конструировали с scFvs, используя последовательности или из антитела KM666 мыши или из его гуманизированной версии huK666, как описано у Nakamura et al (2001 - выше) (варианты (a) и (b) выше на фиг. 2). Эти рецепторы сравнивали по экспрессии/стабильности и обнаружили, что они равны для обоих рецепторов. Затем тестировали уничтожение, высвобождение цитокинов и пролиферацию Т-клеток, трансдуцированных этими рецепторами, когда стимулировали целевыми клетками, или не экспрессирующими или экспрессирующим GD2. Пришли к заключению о том, что уничтожение у обоих рецепторов было схожим, но рецептор, основанный на гуманизированном scFv, приводил к превосходящему продуцированию IL-2 и пролиферации (фиг. 3).

Пример 2 - Тестирование эффектов различных форматов спейсеров, оказываемых на экспрессию и функцию

Создавали CAR против GD2 с Fc спейсером, шарниром, шарниром-стеблем CD8 и стеблем CD8 (фиг. 2 (b), (d), (e) и (f) соответственно). Эти CAR совместно экспрессировали с маркерным геном, усеченным CD34, обязательным образом 1:1 с саморасщепляющимся пептидом 2A ящура для того, чтобы сделать возможным точное сравнение (фиг. 4a). Кроме того, scFv huK666 помечали аминоконцевой меткой HA для того, чтобы сделать возможным сравнение экспрессию CAR трансгенным вирусом.

Проточный цитометрический анализ Т-клеток нормального донора, трансдуцированных этими конструкциями, демонстрировал более яркую экспрессию CAR в следующем порядке: Fc > шарнир-стебель=стебель > шарнир (фиг. 4b).

Уничтожение GD2-положительных мишеней по отношению к GD2-отрицательным мишеням сравнивали с использованием анализа высвобождения хрома. Он демонстрировал эффективность уничтожения в следующем порядке: Fc > шарнир-стебель=стебель > шарнир (фиг. 4c).

Высвобождение интерферона-γ и высвобождение IL-2 сравнивали, когда CAR Т-клетки стимулировали GD2-положительными или -отрицательными мишенями.

Высвобождение интерферона-γ схоже у CAR с Fc, шарниром-стеблем и стеблем, но меньше в варианте с шарниром. Высвобождение IL-2 обнаруживали в следующем порядке: Fc, стебель, шарнир-стебель, шарнир (фиг. 4d и e).

Наконец, пролиферацию CAR Т-клеток сравнивали, когда CAR Т-клетки стимулировали GD2-положительными или -отрицательными мишенями. Пролиферацию обнаруживали в следующем порядке: стебель, шарнир-стебель, Fc, шарнир (фиг. 4d и e)

Пример 3 - Мутации FcR устраняют неспецифичную активность

Совокупные данные из приведенных выше примеров подсказывают, что спейсер Fc работает лучше всего. Однако Fc домен *in vivo* может вести к неспецифической активации от клеток, которые экспрессируют Fc рецепторы. Чтобы устранять этот эффект вводили мутации в Fc-область, как показано на фиг. 5(a). Эти мутации не оказывали нежелательных эффектов на экспрессию CAR, как показано на фиг. 5(b).

Кроме того, показано, что эти мутации не оказывали эффекта на функцию

уничтожения CAR (фиг. 5(c)). Наконец, показано, что эти мутации оказывали желаемый эффект в отношении неспецифичного уничтожения FcR-экспрессирующих мишеней (моноцитоподобная линия, называемая THP1) и высвобождения IL-1 $\beta$  этими моноцитами (фиг. 5e).

#### 5 Пример 4 - Оптимизация экспрессирующей кассеты

Ввиду оптимизации экспрессии рецептора тестировали следующее: (a) включение области прикрепления каркаса (SAR) в кассету; (b) включение инсультатора хроматина  $\beta$ -гемоглобина курицы (CHS4) в 3'LTR и (c) оптимизацию кодонов открытой рамки считывания (фиг. 6a). Показано, что включение SAR усовершенствовало свойства экспрессии, как делала оптимизация кодонов, тогда как CHS4 оказывал небольшой эффект (фиг. 6b). Объединение SAR и оптимизации кодонов аддитивно усовершенствовало экспрессию (фиг. 6c)

#### Пример 5 - Сравнение различных эндодоменов

Создавали конструкции с тремя различными эндодоменами: трансмембранный домен CD28 с эндодоменом CD3- $\zeta$  (CD28tmZ); трансмембранный домен CD28 с эндодоменом CD28 и эндодоменом CD3- $\zeta$  (CD28Z) и трансмембранный домен CD28, эндодомен CD28, эндодомен OX30 и эндодомен CD3- $\zeta$  (CD28OXZ) с CAR в формате с Fc спейсером. Отмечали увеличение пролиферации, высвобождения IFN- $\gamma$  и высвобождения IL-2 в порядке CD28tmZ < CD28Z < CD28OXZ (фиг. 7).

#### 20 Пример 6 - Коэкспрессия с геном самоубийства iCasp9

Ген самоубийства iCasp9 совместно экспрессировали с CAR против GD2 (фиг. 8a - CAR был в формате Fc-спейсера, CD28OXZ выбирали произвольно, чтобы продемонстрировать функцию). CAR мог быть хорошо экспрессирован, несмотря на коэкспрессию с iCasp9 (фиг. 8b). Активация iCasp9 с использованием низкомолекулярного димеризатора вел к удалению CAR положительных Т-клеток (фиг. 8b). Т-клетки iCasp9-GD2CAR, которые подвергали воздействию этого димеризатора, теряли свою GD2-специфичность, когда на них воздействовал димеризатор (фиг. 8c).

#### Пример 7 - Коэкспрессия с геном самоубийства RQR8

CAR против GD2 совместно экспрессировали с геном самоубийства наподобие RQR8 (фиг. 9a - CAR был в формате Fc-спейсера, CD28Z выбирали произвольно для того, чтобы продемонстрировать функцию). Было возможно совместно экспрессировать рецептор и CAR (фиг. 9b). Активация функции гена самоубийства RQR8 с использованием ритуксимаба и комплемента приводила к удалению трансдуцированных Т-клеток и утрате распознавания GD2 (фиг. 9 c и d).

#### 35 Пример 8 - Экспрессия GD2-синтазы и GM3-синтазы ведет к экспрессии GD2 в любой клеточной линии

Для того чтобы стимулировать Т-клетки GD2CAR в культуре, чтобы иметь идеальные GD2- или GD2+ мишени и иметь возможность создавать сингенные клетки для моделей на небольших животных, желательно иметь возможность трансгенной экспрессии GD2 на клеточной линии. GD2 не является белком и требует синтеза с помощью сложного набора ферментов. Здесь показано, что трансгенная экспрессия только двух ферментов - GM3-синтазы и GD2-синтазы - ведет к яркой экспрессии GD2 во всех клеточных линиях, трансдуцированных до настоящего момента (фиг. 10).

#### Пример 9 - Функция CAR против GD2 in vivo

45 Конструировали клеточную линию CT26 для того, чтобы экспрессировать GD2, как описано выше (обозначена CT26 клон #7 или кратко CT25#7). Или  $2 \times 10^5$  клеток дикого типа или GD2-положительных CT26 клеток инокулировали в бока мышей C57BL/6 (сингенные с CT26). Через 10 суток после опухолевого стимула получали

трансдуцированные имитатором и трансдуцированные CAR против GD2 сингенные спленоциты. Мышей делили на следующие 4 когорты: мыши с GD2-экспрессирующими CT26 опухолями, получающие спленоциты с CAR против GD2; GD2-экспрессирующие CT26 опухоли, получающие трансдуцированные имитатором спленоциты; GD2-отрицательные (дикого типа) CT26 опухоли со спленоцитами с CAR против GD2; и GD2-экспрессирующие CT26 опухоли, не получающие спленоциты. Опухоль измеряли с использованием цифрового штангенциркуля в 3 измерениях и при этом оценивали объем. На фиг. 11 представлены кривые роста опухолей. Только GD2-положительные опухоли у мышей, получающих Т-клетки с CAR против GD2, имели небольшой или нулевой рост.

Пример 10 - Сравнение функций CAR, содержащих антигенсвязывающие домены, основанные на huK666 и 14g2a

Антигенсвязывающий домен CAR может влиять на его функцию. В этом исследовании функция CAR по изобретению с антигенсвязывающим доменом на основании huK666 с CAR сравнивали с эквивалентным CAR, имеющим антигенсвязывающий домен на основании 14g2a.

Антитело 14g2a можно рассматривать в качестве золотого стандарта антитела против GD2, поскольку его используют в качестве терапевтического mAb и оно является единственным scFv, который тестировали в исследовании CAR.

CAR второй генерации конструировали и экспрессировали на основании huK666 или 14g2a. Их структура представлена на фиг. 14a.

Ретровирусы получали посредством временной трансфекции клеток 293Т плазмидами, кодирующими GD2 CAR, gag/pol и оболочечный белок RD114. После 3 суток супернатанты собирали и использовали для того, чтобы трансдуцировать РНА/IL-2-активированные PBMC с использованием равных титров ретровируса на чашках, покрытых ретронектином. CAR различались только их антигенсвязывающим доменом. В обоих случаях связывающие домены были соединены с мембраной с использованием Fc сегмента IgG и содержали внутриклеточные активирующие мотивы из CD28 и CD3-ζ. Через шесть суток после трансдукции CAR-экспрессию подтверждали с помощью проточной цитометрии и PBMC культивировали в соотношении 1:1 к GD2-положительными клетками Lan1 (GD2-положительная клеточная линия) или GD2-отрицательными клетками A204 (GD2-отрицательная клеточная линия рабдомиосаркомы). После одних суток супернатанты из этих совместных культур анализировали на уровне интерферона-γ с помощью ELISA и оценивали Т-клеточную пролиферацию с помощью проточной цитометрии после 6 суток.

Результаты представлены на фиг. 14 и 15. На 24 часа в супернатанте измеряли интерферон-γ. Показано, что Т-клетки с huK666 CAR продуцируют больше IFN-γ (фиг. 14b). После одной недели Т-клетки считали и было показано, что huK666 CAR имеет более высокую пролиферацию (фиг. 14c).

После одной недели совместной культуры с клеточной линией нейробластомы LAN1, клетки собирали и анализировали посредством проточной цитометрии. Экспрессия CD45 делала возможно дифференциацию лимфоидных клеток и нелимфоидных клеток с CD45-клетками, которые представляют собой клетки LAN-1. Кроме того, окрашивание с использованием CD3/QBEND/10 делало возможным подсчет Т-клеток с CAR.

Обнаружено, что Т-клетки с huK666 CAR пролиферируют лучше и уничтожают более полно, чем 14g2a эквиваленты (фиг. 15).

Все публикации, упомянутые выше в описании, включены в настоящий документ посредством ссылки. Специалистам в данной области будут видны различные



модификации и вариации описанных способов и системы по изобретению, не отступающие от объема и сущности изобретения. Несмотря на то, что изобретение описано применительно к конкретным предпочтительным вариантам осуществления, следует понимать, что изобретение, как заявлено, не следует чрезмерно ограничивать такими конкретными вариантами осуществления. В действительности, различные модификации описанных способов осуществления изобретения, которые очевидны специалистам в молекулярной биологии или связанных областях, предназначены для включения в объем следующей формулы изобретения.

(57) Формула изобретения

1. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий:
  - i) дисиалоганглиозид (GD2)-связывающий домен, который содержит
    - a) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую VH домен, который имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, и
    - b) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую VL домен, который имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12;
  - ii) спейсерный домен;
  - iii) трансмембранный домен; и
  - iv) внутриклеточный домен Т-клеточной сигнализации.
2. CAR по п.1, в котором GD2-связывающий домен содержит последовательность, которая представлена в SEQ ID NO: 8.
3. CAR по п.1, который содержит трансмембранный домен, который содержит последовательность, которая представлена в SEQ ID NO: 13, или ее вариант, обладающий по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей.
4. CAR по п.1, в котором GD2-связывающий домен и трансмембранный домен соединены с помощью спейсера.
5. CAR по п.4, в котором спейсер содержит одно из следующего: Fc домен IgG1 человека; шарнир IgG1; шарнир IgG1-стебель CD8 или стебель CD8.
6. CAR по п.5, в котором спейсер содержит шарнир IgG1 - стебель CD8 или стебель CD8.
7. CAR по п.5, в котором спейсер содержит Fc домен IgG1 или его вариант.
8. CAR по п.7, в котором спейсер содержит Fc домен IgG1, который содержит последовательность, которая представлена в SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 24, или ее вариант, обладающий по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей.
9. CAR по п.1, который содержит внутриклеточный домен передачи Т-клеточных сигналов.
10. CAR по п.9, в котором внутриклеточный домен передачи Т-клеточных сигналов содержит один или несколько из следующих эндодоменов: эндодомен CD28; эндодомен OX40 и CD3-ζ.
11. CAR по п.10, в котором внутриклеточный домен передачи Т-клеточных сигналов содержит все из следующих эндодоменов: эндодомен CD28; эндодомен OX40 и CD3-ζ.
12. CAR по п.1, который содержит последовательность, представленную в виде любой из SEQ ID NO: 27-35.
13. Нуклеиновая кислота, которая кодирует CAR по любому из пп. 1-12.
14. Нуклеиновая кислота по п.13, в которой оптимизированы кодоны.
15. Нуклеиновая кислота по п.13, которая содержит последовательность, которая представлена в SEQ ID NO: 25.
16. Нуклеиновая кислота по п.13, которая также кодирует ген самоубийства.

17. Вектор экспрессии, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 13-16.

18. Т-клетка, способная уничтожать клетку-мишень, экспрессирующую GD2, причем Т-клетка экспрессирует CAR по любому из пп. 1-12 и получена путем трансфекции или  
5 трансдукции вектором по п.17.

19. Т-клетка, способная уничтожать клетку-мишень, экспрессирующую GD2, причем Т-клетка совместно экспрессирует CAR по любому из пп. 1-12 и ген самоубийства и получена путем трансфекции или трансдукции вектором по п.17.

20. Т-клетка по п.19, в которой ген самоубийства представляет собой iCasp9 или  
10 RQR8.

21. Способ получения Т-клетки по любому из пп. 18-20, который включает стадию введения в Т-клетку вектора по п.17.

22. Фармацевтическая композиция для лечения злокачественной опухоли, экспрессирующей GD2, которая содержит Т-клетку по любому из пп. 18-20 вместе с  
15 фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или эксципиентом.

23. Способ лечения злокачественной опухоли, экспрессирующей GD2, который включает стадию введения Т-клетки по любому из пп. 18-20 пациенту.

24. Способ по п.23, в котором злокачественная опухоль представляет собой нейробластому.

20 25. Т-клетка по любому из пп. 18-20 для применения в лечении злокачественной опухоли.

26. Применение Т-клетки по любому из пп. 18-20 в получении лекарственного средства для лечения злокачественной опухоли, экспрессирующей GD2.

25

30

35

40

45

1

1

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> UCL Business PLC  
 <120> ХИМЕРНЫЙ АНТИГЕННЫЙ РЕЦЕПТОР  
 <130> P103293PCT  
 <150> 1403972.1  
 <151> 2014-03-06  
 <160> 37  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 5  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> CDR1 вариабельной области тяжелой цепи  
 <400> 1  
 Ser Tyr Asn Ile His  
 1 5  
 <210> 2  
 <211> 16  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> CDR2 вариабельной области тяжелой цепи  
 <400> 2  
 Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser  
 1 5 10 15  
 <210> 3  
 <211> 10  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> CDR3 вариабельной области тяжелой цепи  
 <400> 3  
 Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr  
 1 5 10  
 <210> 4  
 <211> 12  
 <212> Белок

2

2

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR1 вариабельной области легкой цепи

<400> 4

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His  
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR2 вариабельной области легкой цепи

<400> 5

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR3 вариабельной области легкой цепи

<400> 6

Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro Ile Thr  
1 5

<210> 7

<211> 243

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность KM666 мыши

<400> 7

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Ala Pro Ser Gln  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ala Ser Tyr  
20 25 30

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
35 40 45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met  
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Lys Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile  
130 135 140

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser  
145 150 155 160

Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly  
165 170 175

Ala Ser Pro Lys Val Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly  
180 185 190

Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu  
195 200 205

Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln  
210 215 220

Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu  
225 230 235 240

Val Lys Arg

<210> 8  
<211> 242  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность  
<220>  
<223> Последовательность гуманизированного KM666

&lt;400&gt; 8

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ala Ser Tyr  
 20 25 30

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met  
 50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Phe Leu  
 65 70 75 80

Lys Met Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

Lys Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asn Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu  
 130 135 140

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser  
 145 150 155 160

Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Lys  
 165 170 175

Ala Pro Lys Val Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val  
 180 185 190

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr  
 195 200 205

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 210 215 220

Tyr Ser Gly Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

5

225 230 235 240

Lys Arg

<210> 9  
<211> 118  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Последовательность VN KM666 мыши (вариабельная область тяжелой цепи)

<400> 9

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Ala Pro Ser Gln  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ala Ser Tyr  
20 25 30

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
35 40 45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met  
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Lys Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala  
115

<210> 10  
<211> 118  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Последовательность VN гуманизированного KM666

<400> 10

6

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ala Ser Tyr  
20 25 30

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
35 40 45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met  
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Phe Leu  
65 70 75 80

Lys Met Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Lys Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 11

<211> 108

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность VL KM666 мыши (вариабельная область легкой цепи)

<400> 11

Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser  
20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Ala Ser Pro Lys Val Trp  
35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu



7

65					70											75										80
Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Pro										
				85						90					95											
Ile	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Val	Lys															
			100					105																		

<210> 12  
 <211> 108  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Последовательность VL гуманизированного KM666

<400>	12
-------	----

Glu	Asn	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	

Asp	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Ser
			20					25					30		

Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Val	Trp
		35					40					45			

Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				

Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln
65					70					75					80

Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Pro
				85					90					95	

Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys				
			100					105							

<210> 13  
 <211> 27  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Трансмембранный домен

<400>	13
-------	----

Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

8

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val  
20 25

<210> 14  
<211> 39  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> эндодомен CD28

<400> 14

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr  
1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro  
20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr  
35

<210> 15  
<211> 38  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> эндодомен CD40

<400> 15

Arg Ser Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly  
1 5 10 15

Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His  
20 25 30

Ser Thr Leu Ala Lys Ile  
35

<210> 16  
<211> 114  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> эндодомен CD3?

<400> 16

Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln  
1 5 10 15

Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu  
20 25 30

Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly  
35 40 45

Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu  
50 55 60

Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly  
65 70 75 80

Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser  
85 90 95

Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro  
100 105 110

Pro Arg

<210> 17  
<211> 153  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CD28Z

<400> 17

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr  
1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro  
20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser  
35 40 45

Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu  
50 55 60

Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg

10																	
65				70				75				80					
Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln		
				85					90					95			
Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr		
				100					105					110			
Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp		
				115					120					125			
Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala		
				130					135					140			
Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg									
				145					150								
<210> 18																	
<211> 189																	
<212> Белок																	
<213> Искусственная последовательность																	
<220>																	
<223> CD280XZ																	
<400> 18																	
Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr		
1					5					10					15		
Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	Pro		
				20					25					30			
Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser	Arg	Asp	Gln	Arg	Leu	Pro	Pro		
				35					40					45			
Asp	Ala	His	Lys	Pro	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Phe	Arg	Thr	Pro	Ile	Gln		
				50					55					60			
Glu	Glu	Gln	Ala	Asp	Ala	His	Ser	Thr	Leu	Ala	Lys	Ile	Arg	Val	Lys		
				65					70					75			
Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln		
				85					90					95			
Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu		
				100					105					110			

11

Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg  
115 120 125

Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met  
130 135 140

Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly  
145 150 155 160

Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp  
165 170 175

Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
180 185

<210> 19  
<211> 20  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Сигнальный пептид

<400> 19

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly  
20

<210> 20  
<211> 234  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Шарнир-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> из спейсера IgG1 человека

<400> 20

Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
1 5 10 15

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
20 25 30

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

12

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val  
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr  
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
180 185 190

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

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp  
225 230

<210> 21  
<211> 46  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Спейсер из стебля CD8 человека

<400> 21

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala

13

1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly  
20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile  
35 40 45

<210> 22  
<211> 20  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Спейсер из шарнира IgG1 человека

<400> 22

Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
1 5 10 15

Lys Asp Pro Lys  
20

<210> 23  
<211> 237  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Спейсер шарнир IgG1-Fc

<400> 23

Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
1 5 10 15

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
20 25 30

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

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
50 55 60

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
65 70 75 80

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

14

85 90 95

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
100 105 110

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
115 120 125

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu  
130 135 140

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
145 150 155 160

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
165 170 175

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
180 185 190

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
195 200 205

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Lys  
225 230 235

<210> 24  
<211> 236  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Спейсер из шарнира IgG1 - Fc, модифицированный для того, чтобы  
удалить мотивы распознавания Fc рецептора

<400> 24

Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
1 5 10 15

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
20 25 30

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



15

```

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
  50                      55                      60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
  65                      70                      75                      80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
                      85                      90                      95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
          100                      105                      110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
          115                      120                      125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
          130                      135                      140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
  145                      150                      155                      160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
          165                      170                      175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
          180                      185                      190

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

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Lys
  225                      230                      235

<210>  25
<211>  6014
<212>  DNA
<213>  Искусственная последовательность

<220>
<223>  Ретровирусная кассета

<400>  25
tgaaagaccc  cacctgtagg  tttggcaagc  tagcttaagt  aacgccattt  tgcaaggcat

```

60

ggaaaaatac    ataactgaga    atagaaaagt    tcagatcaag    gtcaggaaca    gatggaacag  
120

ctgaatatgg    gccaaacagg    atatctgtgg    taagcagttc    ctgccccggc    tcagggccaa  
180

gaacagatgg    aacagctgaa    tatgggccaa    acaggatatc    tgtggttaagc    agttcctgcc  
240

cgggctcagg    gccaagaaca    gatggcccc    agatgcggtc    cagccctcag    cagtttctag  
300

agaaccatca    gatgtttcca    ggggtgcccc    aggacctgaa    atgaccctgt    gccttatttg  
360

aactaaccaa    tcagttcgct    tctcgcttct    gttcgcgcgc    ttatgtctccc    cgagctcaat  
420

aaaagagccc    acaaccctc    actcggggcg    ccagtcctcc    gattgactga    gtcgcccggg  
480

taccctgtga    tccaataaac    cctcttgacg    ttgcatccga    cttgtggtct    cgctgttctt  
540

tgggagggtc    tcctctgagt    gattgactac    ccgtcagcgg    gggctcttca    tttgggggct  
600

cgtccgggat    cgggagacct    ctgcccaggg    accaccgacc    caccaccggg    aggtaagctg  
660

gccagcaact    tatctgtgtc    tgtccgattg    tctagtgtct    atgactgatt    ttatggcctt  
720

gcgtcggtag    tagttagcta    actagctctg    tatctggcgg    acccgtgggtg    gaactgacga  
780

gttcggaaca    cccggccgca    accctgggag    acgtcccagg    gacttcgggg    gccgtttttg  
840

tggcccgacc    tgagtccata    aatcccgatc    gtttaggact    ctttggtgca    ccccccttag  
900

aggagggata    tgtggttctg    gtaggagacg    agaacctaaa    acagttcccg    cctccgtctg  
960

aatttttgct    ttcgggtttg    gaccgaagcc    gcgccgcgcg    tcttgtctgc    tgcagcatcg  
1020

ttctgtgttg    tctctgtctg    actgtgtttc    tgtatttgtc    tgaaaaatatg    ggccccggct  
1080

agcctgttac    cactccctta    agtttgacct    taggtcactg    gaaagatgtc    gagcggatcg  
1140

ctcacaacca    gtcggtagat    gtcaagaaga    gacgttgggt    taccttctgc    tctgcagaat  
1200

ggccaacctt    taacgtcgga    tggccgcgag    acggcacctt    taaccgagac    ctcatcacc

1260					
aggTTaagat	caaggTcttt	tcacctggcc	cgcatggaca	cccagaccag	gtgggggtaca
1320					
tcgtgacctg	ggaagccttg	gcttttgacc	cccctccctg	ggtcaagccc	tttgtacacc
1380					
ctaagcctcc	gcctcctctt	cctccatccg	ccccgtctct	cccccttgaa	cctcctcggt
1440					
cgaccccgcc	tcgatcctcc	ctttatccag	ccctcactcc	ttctctaggc	gccccatat
1500					
ggccatatga	gatcttatat	ggggcacccc	cgccccctgt	aaacttccct	gaccctgaca
1560					
tgacaagagt	tactaacagc	ccctctctcc	aagctcactt	acaggctctc	tacttagtcc
1620					
agcacgaagt	ctggagacct	ctggcggcag	cctaccaaga	acaactggac	cgaccgggtg
1680					
tacctcacc	ttaccgagtc	ggcgacacag	tgtgggtccg	ccgacaccag	actaagaacc
1740					
tagaacctcg	ctggaaagga	ccttacacag	tcctgctgac	cacccccacc	gccctcaaag
1800					
tagacggcat	cgagccttgg	atacacgccg	cccacgtgaa	ggctgccgac	cccggggggtg
1860					
gaccatcctc	tagactgcc	acatgggcac	cagcctgctg	tgctggatgg	ccctgtgcct
1920					
gctgggcgcc	gaccacgccg	atgcctgccc	ctacagcaac	cccagcctgt	gcagcggagg
1980					
cggcggcagc	gagctgccc	cccagggcac	cttctccaac	gtgtccacca	acgtgagccc
2040					
agccaagccc	accaccaccg	cctgtcctta	ttccaatcct	tccctgtgta	gcggaggggg
2100					
aggcagccc	gccccagac	ctcccacccc	agccccacc	atcgccagcc	agcctctgag
2160					
cctgagaccc	gaggcctgcc	gccagccgc	cggcggcgcc	gtgcacacca	gaggcctgga
2220					
tttcgcctgc	gatatctaca	tctgggcccc	actggccggc	acctgtggcg	tgctgtgct
2280					
gagcctgggtg	atcacctgt	actgcaacca	ccgcaaccgc	aggcgcgtgt	gcaagtgccc
2340					
caggcccgtg	gtgagagccg	agggcagagg	cagcctgctg	acctgcggcg	acgtggagga
2400					
gaaccaggc	cccatggaga	ccgacacct	gctgctgtgg	gtgctgctgc	tgtgggtgcc

2460  
 aggcagcacc 2520 ggccaggtgc agctgcagga gtctggccca ggccctggtga agcccagcca  
 gaccctgagc 2580 atcacctgca ccgtgagcgg cttcagcctg gccagctaca acatccactg  
 ggtgcggcag 2640 cccccaggca agggcctgga gtggctgggc gtgatctggg ctggcggcag  
 caccaactac 2700 aacagcgccc tgatgagccg gctgaccatc agcaaggaca acagcaagaa  
 ccaggtgttc 2760 ctgaagatga gcagcctgac agccgccgac accgccgtgt actactgcgc  
 caagcggagc 2820 gacgactaca gctggttcgc ctactggggc cagggcaccc tggtgaccgt  
 gagctctggc 2880 ggaggcggct ctggcggagg cggctctggc ggaggcggca gcgagaacca  
 gatgacccag 2940 agccccagca gcttgagcgc cagcgtgggc gaccgggtga ccatgacctg  
 cagagccagc 3000 agcagcgtga gcagcagcta cctgcactgg taccagcaga agagcggcaa  
 ggccccaaag 3060 gtgtggatct acagcaccag caacctggcc agcggcgtgc ccagccggtt  
 cagcggcagc 3120 ggagcgggca ccgactacac cctgaccatc agcagcctgc agcccagga  
 cttgcgccac 3180 tactactgcc agcagtacag cggctacccc atcaccttcg gccagggcac  
 caaggtggag 3240 atcaagcggc cggatccgc cgagcccaa tctcctgaca aaactcacac  
 atgcccaccg 3300 tgcccagcac ctcccgtggc cggcccgtca gtcttcctct tcccccaaa  
 acccaaggac 3360 accctcatga tcgcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt  
 gagccacgaa 3420 gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa  
 tgccaagaca 3480 aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct  
 caccgtcctg 3540 caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa  
 agccctccca 3600 gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc  
 acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac

3660					
ctgcctggtc 3720	aaaggcttct	atcccagcga	catcgccgtg	gagtgggaga	gcaatgggca
accggagAAC 3780	aactacaaga	ccacgcctcc	cgtgctggac	tccgacggct	ccttcttctt
ctacagcaag 3840	ctcaccgtgg	acaagagcag	gtggcagcag	gggaacgtct	tctcatgctc
cgtgatgcat 3900	gaggccctgc	acaatcacta	taccagaaa	tctctgagtc	tgagcccagg
caagaaggac 3960	cccaagttct	gggtcctggt	ggtggtggga	ggcgtgctgg	cctgttactc
tctcctgggtg 4020	accgtggcct	tcacatctct	ctgggtgcgc	tccaagagga	gcaggctcct
gcacagtgc 4080	tacatgaaca	tgactccccg	ccgccccggg	cccacccgca	agcattacca
gccctatgcc 4140	ccaccacgcg	acttcgcagc	ctatcgctcc	cggtggaagt	tctctcgctc
tgccgatgcc 4200	ccagcctatc	agcagggccca	gaatcagctg	tacaatgaac	tgaacctggg
caggcgggag 4260	gagtacgacg	tgctggataa	gcggagaggc	agagaccccg	agatgggagg
caaaccacgg 4320	cgcaaaaatc	cccaggaggg	actctataac	gagctgcaga	aggacaaaat
ggccgaggcc 4380	tattccgaga	tgggcatgaa	gggagagaga	agacgcggaa	agggccacga
cggcctgtat 4440	cagggattgt	ccaccgctac	aaaagataca	tatgatgccc	tgacatgca
ggccctgcc 4500	cccagatgac	gcgtatcgat	actgttctca	tcacatcata	tcaaggttat
ataccatcaa 4560	tattgccaca	gatgttactt	agccttttaa	tatttctcta	atttagtgta
tatgcaatga 4620	tagttctctg	atctctgaga	ttgagtttct	catgtgtaat	gattatttag
agtttctctt 4680	tcacatgttc	aaatttttgt	ctagttttat	tttttactga	tttgtaagac
ttctttttat 4740	aatctgcata	ttacaattct	ctttactggg	gtgttgcaaa	tattttctgt
cattctatgg 4800	cctgactttt	cttaatgggt	ttttaatttt	aaaaataagt	cttaatatct
atgcaatcta	attaacaatc	ttttctttgt	ggttaggact	ttgagtcata	agaaattttt

4860  
ctctacactg aagtcgatgat ggcattgcttc tatattatttt tctaaaagat ttaaagtttt  
4920  
gccttctcca tttagactta taattcactg gaattttttt gtgtgtatgg tatgacatat  
4980  
gggttccctt ttatttttta catataaata tatttccctg tttttctaaa aaagaaaaag  
5040  
atcatcatatt tccattgta aaatgccata tttttttcat aggtcactta catatatcaa  
5100  
tggttctggt tctgagctct actctatttt atcagcctca ctgtctatcc ccacacatct  
5160  
catgctttgc tctaaatctt gatatttagt ggaacattct tcccatattt gttctacaag  
5220  
aatatttttg ttattgtctt tgggctttct atatacattt tgaaatgagg ttgacaagtt  
5280  
cggattagtc caatttgta aagacaggat atcagtggtc caggctctag ttttgactca  
5340  
acaatatcac cagctgaagc ctatagagta cgagccatag ataaaaataa agattttatt  
5400  
tagtctccag aaaaaggggg gaatgaaaga cccacactgt aggtttggca agctagctta  
5460  
agtaacgcca ttttgcaagg catggaaaaa tacataactg agaatagaga agttcagatc  
5520  
aaggtcagga acagatggaa cagctgaata tgggccaaac aggatatctg tggttaagcag  
5580  
ttcctgcccc ggctcagggc caagaacaga tggaacagct gaatatgggc caaacaggat  
5640  
atctgtggta agcagttcct gcccgggctc agggccaaga acagatggtc ccagatgctg  
5700  
gtccagccct cagcagtttc tagagaacca tcagatgttt ccagggtgcc ccaaggacct  
5760  
gaaatgaccc tgtgccttat ttgaactaac caatcagttc gcttctcgct tctgttcgctg  
5820  
cgcttctgct ccccgagctc aataaaagag cccacaacct ctcactcggg gcgccagtc  
5880  
tccgattgac tgagtcgccc ggggtaccgt gtatccaata aaccctcttg cagttgcac  
5940  
cgacttgtgg tctcgctggt ccttgggagg gtctcctctg agtgattgac taccgctcag  
6000  
cgggggtctt tcac

6014

```

<210> 26
<211> 719
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CAR против GD2, muKM666-HCH2CH3-CD28OXZ

<400> 26

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1          5          10          15

Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val
20          25          30

Ala Pro Ser Gln Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser
35          40          45

Leu Ala Ser Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly
50          55          60

Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn
65          70          75          80

Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser
85          90          95

Gln Val Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met
100         105         110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp
115         120         125

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asn Val Leu Thr Gln
145         150         155         160

Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr
165         170         175

Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln
180         185         190

```

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



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

24

Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg  
675 680 685

Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr  
690 695 700

Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
705 710 715

<210> 27  
<211> 718  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CAR против GD2, huKM666-HCH2CH3-CD28OXZ

<400> 27

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val  
20 25 30

Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser  
35 40 45

Leu Ala Ser Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly  
50 55 60

Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn  
65 70 75 80

Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn  
85 90 95

Gln Val Phe Leu Lys Met Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val  
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp  
115 120 125

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asn Gln Met Thr Gln Ser

25																
145				150				155				160				
Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Cys	
				165					170					175		
Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	
				180					185					190		
Lys	Ser	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Val	Trp	Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser	Asn	Leu	
				195					200					205		
Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	
				210					215					220		
Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	
				225					230					235		
Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Pro	Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	
				245					250					255		
Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Ser	Asp	Pro	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Pro	Asp	
				260					265					270		
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	
				275					280					285		
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
				290					295					300		
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
				305					310					315		
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
				325					330					335		
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
				340					345					350		
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
				355					360					365		
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	
				370					375					380		
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	

26

385				390				395				400				
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
				405					410					415		
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
				420					425					430		
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	
				435					440					445		
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	
				450					455					460		
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
				465					470					475		
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
				485					490					495		
Gly	Lys	Lys	Asp	Pro	Lys	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	
				500					505					510		
Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	
				515					520					525		
Val	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	
				530					535					540		
Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	
				545					550					555		
Pro	Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser	Arg	Asp	Gln	Arg	Leu	Pro	
				565					570					575		
Pro	Asp	Ala	His	Lys	Pro	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Phe	Arg	Thr	Pro	Ile	
				580					585					590		
Gln	Glu	Glu	Gln	Ala	Asp	Ala	His	Ser	Thr	Leu	Ala	Lys	Ile	Arg	Val	
				595					600					605		
Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	
				610					615					620		
Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	

27

625                      630                      635                      640

Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg  
645 650 655

Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys  
660 665 670

Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg  
675 680 685

Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys  
690 695 700

Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
705 710 715

<210> 28

<211> 717

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

 $\langle 220 \rangle$ 

<223> CAR против GD2, huKM666-HCH2CH3pva-a-CD28OXZ

<400> 28

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val  
20 25 30

Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser  
35 40 45

Leu Ala Ser Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly  
50 55 60

Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn  
65 70 75 80

Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn  
85 90 95

Gln Val Phe Leu Lys Met Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val  
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp  
           115                          120                          125  
  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
       130                          135                          140  
  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asn Gln Met Thr Gln Ser  
 145                          150                          155                          160  
  
 Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Met Thr Cys  
                           165                          170                          175  
  
 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln  
                           180                          185                          190  
  
 Lys Ser Gly Lys Ala Pro Lys Val Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu  
       195                          200                          205  
  
 Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
       210                          215                          220  
  
 Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr  
 225                          230                          235                          240  
  
 Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr  
                           245                          250                          255  
  
 Lys Val Glu Ile Lys Arg Ser Asp Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp  
                           260                          265                          270  
  
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro  
                           275                          280                          285  
  
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala  
       290                          295                          300  
  
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
 305                          310                          315                          320  
  
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
                           325                          330                          335  
  
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
                           340                          345                          350

Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
355						360			365						
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys
370						375			380						
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr
385						390			395			400			
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr
			405						410			415			
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu
			420						425			430			
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu
			435						440			445			
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys
450						455			460						
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
465						470			475			480			
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
			485						490			495			
Lys	Lys	Asp	Pro	Lys	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu
			500						505			510			
Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val
515						520			525						
Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr
530						535			540						
Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	Pro
545						550			555			560			
Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser	Arg	Asp	Gln	Arg	Leu	Pro	Pro
			565						570			575			
Asp	Ala	His	Lys	Pro	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Phe	Arg	Thr	Pro	Ile	Gln
			580						585			590			

30

Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg Val Lys  
595 600 605

Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln  
610 615 620

Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu  
625 630 635 640

Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg  
645 650 655

Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met  
660 665 670

Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly  
675 680 685

Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp  
690 695 700

Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
705 710 715

<210> 29  
<211> 527  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CAR против GD2, huKM666-HSTK-CD28OXZ

<400> 29

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val  
20 25 30

Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser  
35 40 45

Leu Ala Ser Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly  
50 55 60

Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn



31

65					70						75				80
Ser	Ala	Leu	Met	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn
				85					90					95	
Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Met	Ser	Ser	Leu	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Arg	Ser	Asp	Asp	Tyr	Ser	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp
		115					120					125			
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
	130					135					140				
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Asn	Gln	Met	Thr	Gln	Ser
145					150					155					160
Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Cys
				165					170					175	
Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln
			180					185					190		
Lys	Ser	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Val	Trp	Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser	Asn	Leu
		195					200					205			
Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp
	210					215					220				
Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr
225					230					235					240
Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Pro	Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr
				245					250					255	
Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Ser	Asp	Pro	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg
			260					265					270		
Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg
		275					280					285			
Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly
	290					295					300				
Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly

32

305                      310                      315                      320

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe  
325 330 335

Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn  
340 345 350

Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr  
355 360 365

Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Asp Gln Arg Leu  
370 375 380

Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro  
385 390 395 400

Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg  
405 410 415

Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln  
420 425 430

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp  
435 440 445

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro  
450 455 460

Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp  
465 470 475 480

Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg  
485 490 495

Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr  
500 505 510

Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
515 520 525

<210>	30
<211>	527
<212>	Белок
<213>	Искусственная последовательность

<220>

<223> CAR против GD2, huKM666-STK-CD28XOXZ

<400> 30

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val  
20 25 30

Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser  
35 40 45

Leu Ala Ser Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly  
50 55 60

Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn  
65 70 75 80

Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn  
85 90 95

Gln Val Phe Leu Lys Met Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val  
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp  
115 120 125

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asn Gln Met Thr Gln Ser  
145 150 155 160

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Met Thr Cys  
165 170 175

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln  
180 185 190

Lys Ser Gly Lys Ala Pro Lys Val Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu  
195 200 205

Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
210 215 220

Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr  
 225 230 235 240  
 Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr  
 245 250 255  
 Lys Val Glu Ile Lys Arg Ser Asp Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg  
 260 265 270  
 Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg  
 275 280 285  
 Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly  
 290 295 300  
 Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly  
 305 310 315 320  
 Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe  
 325 330 335  
 Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn  
 340 345 350  
 Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr  
 355 360 365  
 Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Asp Gln Arg Leu  
 370 375 380  
 Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro  
 385 390 395 400  
 Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg  
 405 410 415  
 Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln  
 420 425 430  
 Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp  
 435 440 445  
 Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro  
 450 455 460

35

Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp  
465 470 475 480

Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg  
485 490 495

Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr  
500 505 510

Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
515 520 525

<210> 31  
<211> 501  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CAR против GD2, huKM666-HNG-CD28OXZ

<400> 31

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val  
20 25 30

Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser  
35 40 45

Leu Ala Ser Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly  
50 55 60

Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn  
65 70 75 80

Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn  
85 90 95

Gln Val Phe Leu Lys Met Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val  
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp  
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

36

130

135

140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asn Gln Met Thr Gln Ser  
145 150 155 160

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Met Thr Cys  
165 170 175

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln  
180 185 190

Lys Ser Gly Lys Ala Pro Lys Val Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu  
195 200 205

Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
210 215 220

Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr  
225 230 235 240

Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr  
245 250 255

Lys Val Glu Ile Lys Arg Ser Asp Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp  
260 265 270

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val  
275 280 285

Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr  
290 295 300

Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu  
305 310 315 320

His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg  
325 330 335

Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg  
340 345 350

Ser Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly  
355 360 365

Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser

37

370

375

380

Thr Leu Ala Lys Ile Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro  
385 390 395 400

Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly  
405 410 415

Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro  
420 425 430

Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr  
435 440 445

Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly  
450 455 460

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln  
465 470 475 480

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln  
485 490 495

Ala Leu Pro Pro Arg  
500

<210> 32

<211> 642

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CAR против GD2, huKM666-HCH2CH3pvaa-CD28tmZ

<400> 32

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val  
20 25 30

Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser  
35 40 45

Leu Ala Ser Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly  
50 55 60

38

Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn  
65 70 75 80

Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn  
85 90 95

Gln Val Phe Leu Lys Met Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val  
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp  
115 120 125

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asn Gln Met Thr Gln Ser  
145 150 155 160

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Met Thr Cys  
165 170 175

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln  
180 185 190

Lys Ser Gly Lys Ala Pro Lys Val Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu  
195 200 205

Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
210 215 220

Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr  
225 230 235 240

Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr  
245 250 255

Lys Val Glu Ile Lys Arg Ser Asp Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp  
260 265 270

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro  
275 280 285

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala  
290 295 300



Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
305 310 315 320

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
325 330 335

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
340 345 350

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
355 360 365

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
370 375 380

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
385 390 395 400

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
405 410 415

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
420 425 430

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
435 440 445

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
450 455 460

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
465 470 475 480

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
485 490 495

Lys Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu  
500 505 510

Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val  
515 520 525

Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln  
530 535 540

40

Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu  
545 550 555 560

Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly  
565 570 575

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

Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly  
595 600 605

Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser  
610 615 620

Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro  
625 630 635 640

Pro Arg

<210> 33  
<211> 681  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CAR против GD2, huMK666-HCH2CH3pvaa-CD28Z

<400> 33

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val  
20 25 30

Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser  
35 40 45

Leu Ala Ser Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly  
50 55 60

Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn  
65 70 75 80

Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn

41

85 90 95

Gln Val Phe Leu Lys Met Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val  
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp  
115 120 125

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asn Gln Met Thr Gln Ser  
145 150 155 160

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Met Thr Cys  
165 170 175

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln  
180 185 190

Lys Ser Gly Lys Ala Pro Lys Val Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu  
195 200 205

Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
210 215 220

Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr  
225 230 235 240

Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr  
245 250 255

Lys Val Glu Ile Lys Arg Ser Asp Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp  
260 265 270

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro  
275 280 285

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala  
290 295 300

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
305 310 315 320

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

42

325

330

335

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
340 345 350

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
355 360 365

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
370 375 380

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
385 390 395 400

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
405 410 415

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
420 425 430

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
435 440 445

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
450 455 460

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
465 470 475 480

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
485 490 495

Lys Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu  
500 505 510

Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val  
515 520 525

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr  
530 535 540

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

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser

43

565

570

575

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

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

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

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

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

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

Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
675 680

<210> 34

<211> 1103

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CAR против GD2, совместно экспрессированный с геном самоубийства  
iCasp9

<400> 34

Met Leu Glu Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg  
1 5 10 15

Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met  
20 25 30

Leu Glu Asp Gly Lys Lys Val Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro  
35 40 45

Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu  
50 55 60

Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser  
65 70 75 80

Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro  
85 90 95

His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Ser Gly  
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Val Asp Gly Phe Gly Asp Val Gly Ala Leu Glu Ser  
115 120 125

Leu Arg Gly Asn Ala Asp Leu Ala Tyr Ile Leu Ser Met Glu Pro Cys  
130 135 140

Gly His Cys Leu Ile Ile Asn Asn Val Asn Phe Cys Arg Glu Ser Gly  
145 150 155 160

Leu Arg Thr Arg Thr Gly Ser Asn Ile Asp Cys Glu Lys Leu Arg Arg  
165 170 175

Arg Phe Ser Ser Leu His Phe Met Val Glu Val Lys Gly Asp Leu Thr  
180 185 190

Ala Lys Lys Met Val Leu Ala Leu Leu Glu Leu Ala Gln Gln Asp His  
195 200 205

Gly Ala Leu Asp Cys Cys Val Val Val Ile Leu Ser His Gly Cys Gln  
210 215 220

Ala Ser His Leu Gln Phe Pro Gly Ala Val Tyr Gly Thr Asp Gly Cys  
225 230 235 240

Pro Val Ser Val Glu Lys Ile Val Asn Ile Phe Asn Gly Thr Ser Cys  
245 250 255

Pro Ser Leu Gly Gly Lys Pro Lys Leu Phe Phe Ile Gln Ala Cys Gly  
260 265 270

Gly Glu Gln Lys Asp His Gly Phe Glu Val Ala Ser Thr Ser Pro Glu  
275 280 285

Asp Glu Ser Pro Gly Ser Asn Pro Glu Pro Asp Ala Thr Pro Phe Gln  
290 295 300

Glu Gly Leu Arg Thr Phe Asp Gln Leu Asp Ala Ile Ser Ser Leu Pro  
305 310 315 320

45

Thr	Pro	Ser	Asp	Ile	Phe	Val	Ser	Tyr	Ser	Thr	Phe	Pro	Gly	Phe	Val
				325					330						335
Ser	Trp	Arg	Asp	Pro	Lys	Ser	Gly	Ser	Trp	Tyr	Val	Glu	Thr	Leu	Asp
			340					345					350		
Asp	Ile	Phe	Glu	Gln	Trp	Ala	His	Ser	Glu	Asp	Leu	Gln	Ser	Leu	Leu
		355					360					365			
Leu	Arg	Val	Ala	Asn	Ala	Val	Ser	Val	Lys	Gly	Ile	Tyr	Lys	Gln	Met
	370					375					380				
Pro	Gly	Cys	Phe	Asn	Phe	Leu	Arg	Lys	Lys	Leu	Phe	Phe	Lys	Thr	Ser
385					390					395					400
Ala	Ser	Arg	Ala	Glu	Gly	Arg	Gly	Ser	Leu	Leu	Thr	Cys	Gly	Asp	Val
				405					410					415	
Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Glu	Thr	Asp	Thr	Leu	Leu	Leu	Trp	Val
			420					425					430		
Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Pro	Gly	Ser	Thr	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu
		435					440					445			
Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln	Thr	Leu	Ser	Ile	Thr	Cys
	450					455					460				
Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ala	Ser	Tyr	Asn	Ile	His	Trp	Val	Arg
465					470					475					480
Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Ala	Gly
				485					490					495	
Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Met	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser
			500					505					510		
Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Met	Ser	Ser	Leu	Thr
		515					520					525			
Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Arg	Ser	Asp	Asp	Tyr
	530					535					540				
Ser	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
545					550					555					560

46

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	
				565					570					575		
Asn	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	
				580					585					590		
Arg	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Tyr	
				595					600					605		
Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Val	Trp	Ile	
				610					615					620		
Tyr	Ser	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	
				625					630					635		
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	
				645					650					655		
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Pro	Ile	
				660					665					670		
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Ser	Asp	Pro	Ala	
				675					680					685		
Glu	Pro	Lys	Ser	Pro	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	
				690					695					700		
Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	
				705					710					715		
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ala	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	
				725					730					735		
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	
				740					745					750		
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	
				755					760					765		
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	
				770					775					780		
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	
				785					790					795		



Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
805 810 815

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys  
820 825 830

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
835 840 845

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
850 855 860

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
865 870 875 880

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
885 890 895

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
900 905 910

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val  
915 920 925

Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala  
930 935 940

Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser  
945 950 955 960

Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His  
965 970 975

Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg  
980 985 990

Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln  
995 1000 1005

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr  
1010 1015 1020

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly  
1025 1030 1035

Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu  
1040 1045 1050

Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys  
1055 1060 1065

Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly  
1070 1075 1080

Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln  
1085 1090 1095

Ala Leu Pro Pro Arg  
1100

<210> 35

<211> 858

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CAR против GD2, совместно экспрессированный с геном самоубийства  
RQR8

<400> 35

Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala  
1 5 10 15

Asp His Ala Asp Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly  
20 25 30

Gly Gly Gly Ser Glu Leu Pro Thr Gln Gly Thr Phe Ser Asn Val Ser  
35 40 45

Thr Asn Val Ser Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Ala Cys Pro Tyr Ser  
50 55 60

Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ala Pro Arg Pro  
65 70 75 80

Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro  
85 90 95

Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu  
100 105 110

Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys
115120125															
Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Asn	His	Arg
130135140															
Asn	Arg	Arg	Arg	Val	Cys	Lys	Cys	Pro	Arg	Pro	Val	Val	Arg	Ala	Glu
145150155160															
Gly	Arg	Gly	Ser	Leu	Leu	Thr	Cys	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly
165170175															
Pro	Met	Glu	Thr	Asp	Thr	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Trp	Val
180185190															
Pro	Gly	Ser	Thr	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu
195200205															
Val	Lys	Pro	Ser	Gln	Thr	Leu	Ser	Ile	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe
210215220															
Ser	Leu	Ala	Ser	Tyr	Asn	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys
225230235240															
Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Ala	Gly	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr
245250255															
Asn	Ser	Ala	Leu	Met	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys
260265270															
Asn	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Met	Ser	Ser	Leu	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala
275280285															
Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Arg	Ser	Asp	Asp	Tyr	Ser	Trp	Phe	Ala	Tyr
290295300															
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
305310315320															
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Asn	Gln	Met	Thr	Gln
325330335															
Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Met	Thr
340345350															

50

Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	355	360	365	
Gln	Lys	Ser	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Val	Trp	Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser	Asn	370	375	380	
Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	385	390	395	400
Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	405	410	415	
Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Pro	Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	420	425	430	
Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Ser	Asp	Pro	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Pro	435	440	445	
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	450	455	460	
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	465	470	475	480
Ala	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	485	490	495	
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	500	505	510	
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	515	520	525	
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	530	535	540	
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	545	550	555	560
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	565	570	575	
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	580	585	590	

Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	595	600	605	
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	610	615	620	
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	625	630	635	640
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	645	650	655	
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	660	665	670	
Gly	Lys	Lys	Asp	Pro	Lys	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	675	680	685	
Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	690	695	700	
Val	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	705	710	715	720
Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	725	730	735	
Pro	Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	740	745	750	
Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	755	760	765	
Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	770	775	780	
Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	785	790	795	800
Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	805	810	815	
Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	820	825	830	

52

Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp  
835 840 845

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
850 855

<210> 36

<211> 402

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность индуцибельной каспазы 9 (iCasp9)

<400> 36

Met Leu Glu Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg  
1 5 10 15

Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met  
20 25 30

Leu Glu Asp Gly Lys Lys Val Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro  
35 40 45

Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu  
50 55 60

Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser  
65 70 75 80

Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro  
85 90 95

His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Ser Gly  
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Val Asp Gly Phe Gly Asp Val Gly Ala Leu Glu Ser  
115 120 125

Leu Arg Gly Asn Ala Asp Leu Ala Tyr Ile Leu Ser Met Glu Pro Cys  
130 135 140

Gly His Cys Leu Ile Ile Asn Asn Val Asn Phe Cys Arg Glu Ser Gly  
145 150 155 160

Leu Arg Thr Arg Thr Gly Ser Asn Ile Asp Cys Glu Lys Leu Arg Arg

53

165

170

175

Arg Phe Ser Ser Leu His Phe Met Val Glu Val Lys Gly Asp Leu Thr  
180 185 190

Ala Lys Lys Met Val Leu Ala Leu Leu Glu Leu Ala Gln Gln Asp His  
195 200 205

Gly Ala Leu Asp Cys Cys Val Val Val Ile Leu Ser His Gly Cys Gln  
210 215 220

Ala Ser His Leu Gln Phe Pro Gly Ala Val Tyr Gly Thr Asp Gly Cys  
225 230 235 240

Pro Val Ser Val Glu Lys Ile Val Asn Ile Phe Asn Gly Thr Ser Cys  
245 250 255

Pro Ser Leu Gly Gly Lys Pro Lys Leu Phe Phe Ile Gln Ala Cys Gly  
260 265 270

Gly Glu Gln Lys Asp His Gly Phe Glu Val Ala Ser Thr Ser Pro Glu  
275 280 285

Asp Glu Ser Pro Gly Ser Asn Pro Glu Pro Asp Ala Thr Pro Phe Gln  
290 295 300

Glu Gly Leu Arg Thr Phe Asp Gln Leu Asp Ala Ile Ser Ser Leu Pro  
305 310 315 320

Thr Pro Ser Asp Ile Phe Val Ser Tyr Ser Thr Phe Pro Gly Phe Val  
325 330 335

Ser Trp Arg Asp Pro Lys Ser Gly Ser Trp Tyr Val Glu Thr Leu Asp  
340 345 350

Asp Ile Phe Glu Gln Trp Ala His Ser Glu Asp Leu Gln Ser Leu Leu  
355 360 365

Leu Arg Val Ala Asn Ala Val Ser Val Lys Gly Ile Tyr Lys Gln Met  
370 375 380

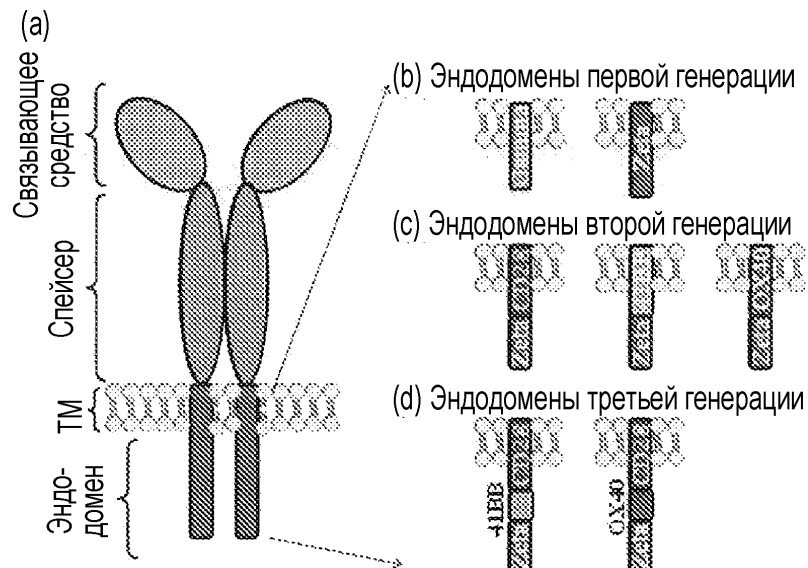
Pro Gly Cys Phe Asn Phe Leu Arg Lys Lys Leu Phe Phe Lys Thr Ser  
385 390 395 400

Ala Ser

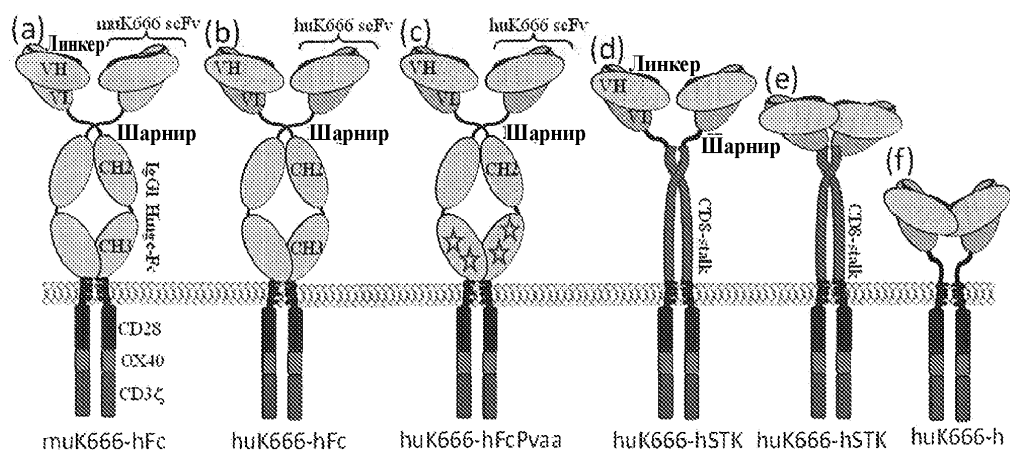
<210> 37  
 <211> 157  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Новый маркер/последовательность гена самоубийства RQR8  
  
 <400> 37  
  
 Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala  
 1 5 10 15  
  
 Asp His Ala Asp Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly  
 20 25 30  
  
 Gly Gly Gly Ser Glu Leu Pro Thr Gln Gly Thr Phe Ser Asn Val Ser  
 35 40 45  
  
 Thr Asn Val Ser Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Ala Cys Pro Tyr Ser  
 50 55 60  
  
 Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ala Pro Arg Pro  
 65 70 75 80  
  
 Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro  
 85 90 95  
  
 Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu  
 100 105 110  
  
 Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys  
 115 120 125  
  
 Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg  
 130 135 140  
  
 Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val  
 145 150 155



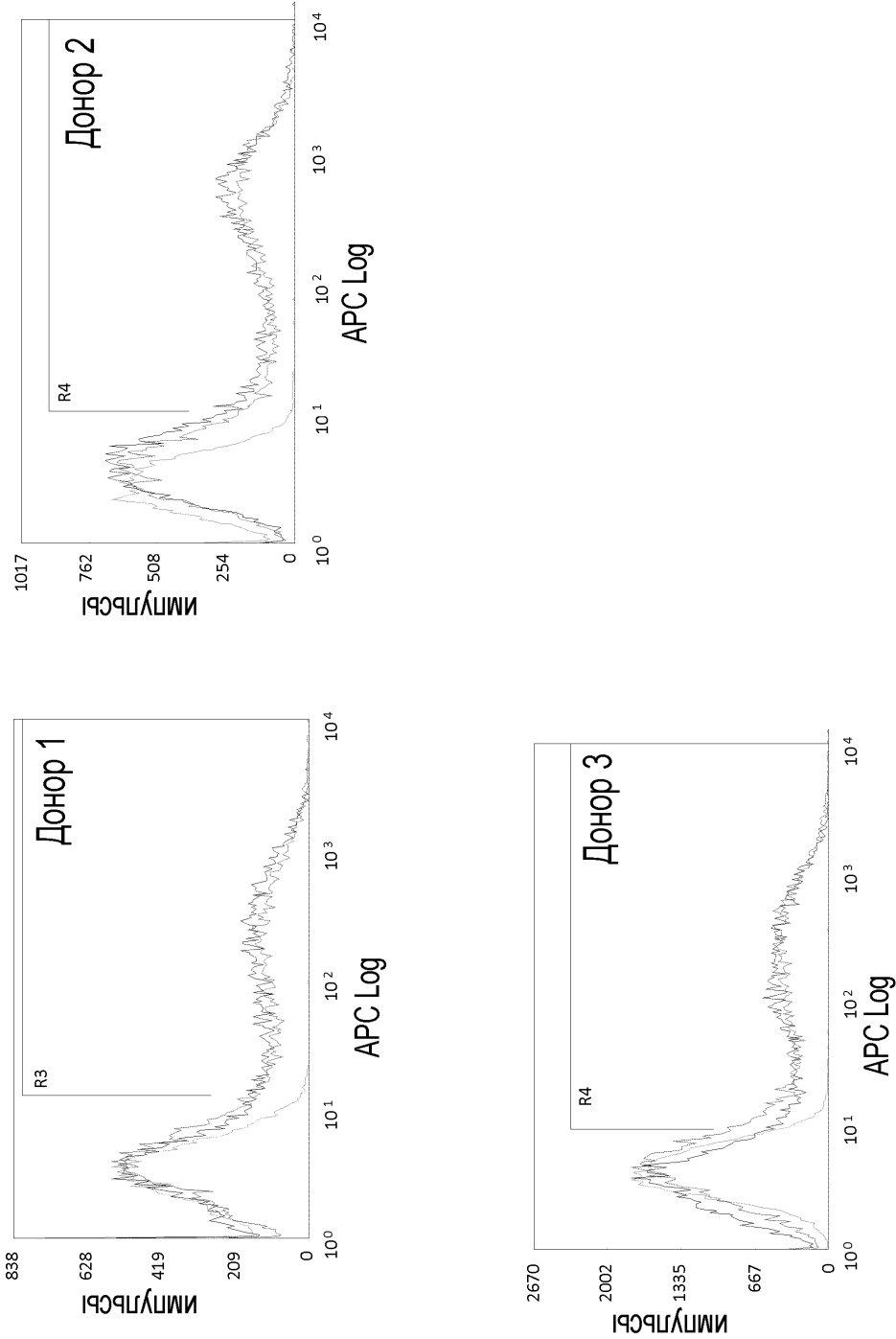
ФИГ.1



ФИГ.2

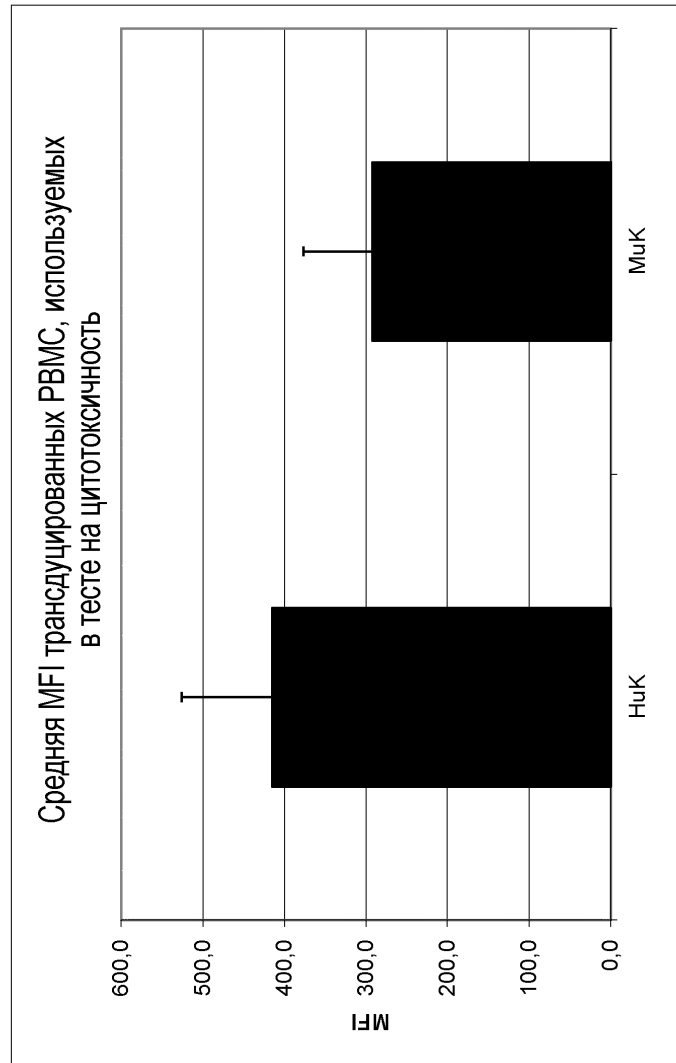


ФИГ.3(а)

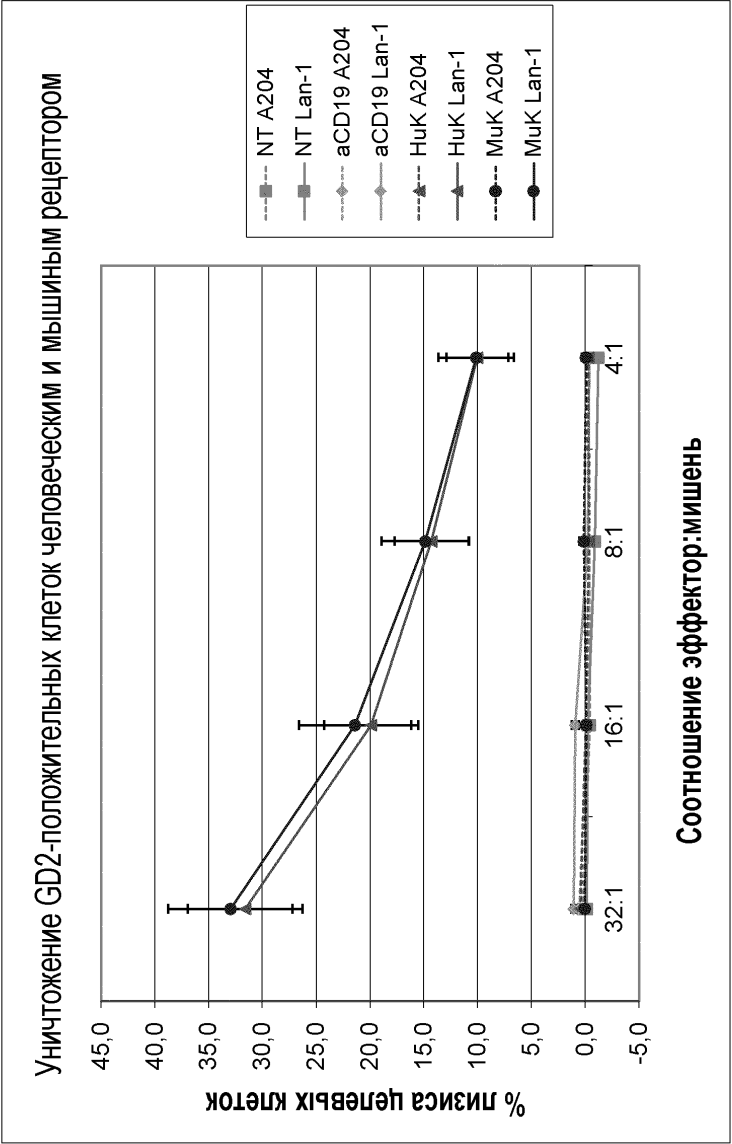


3/18

ФИГ.3(b)



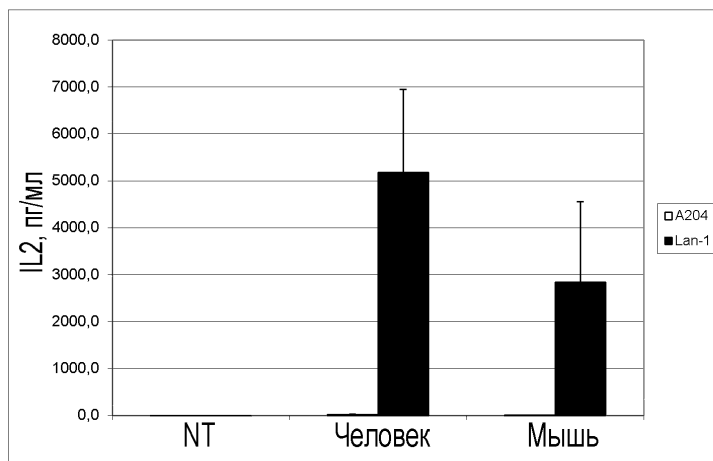
ФИГ.3(с)



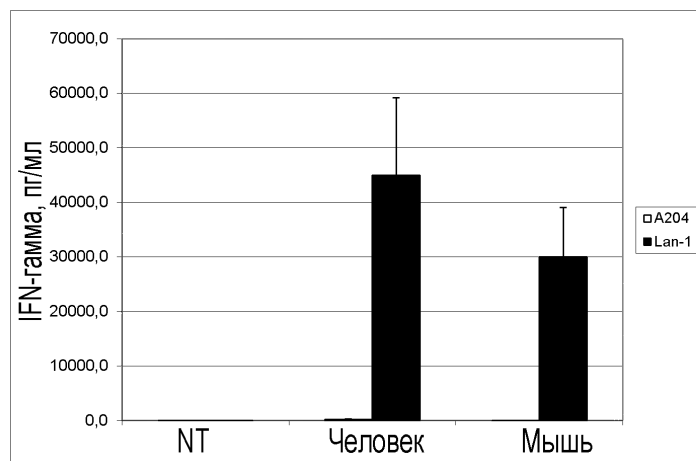
5/18

ФИГ.3(d)-(f)

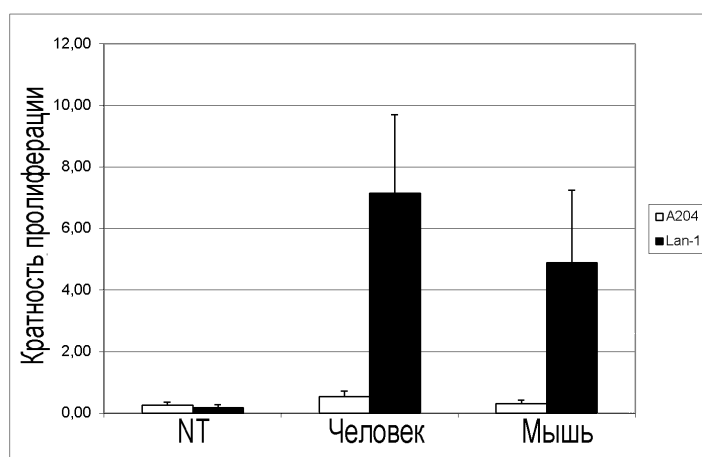
(d)

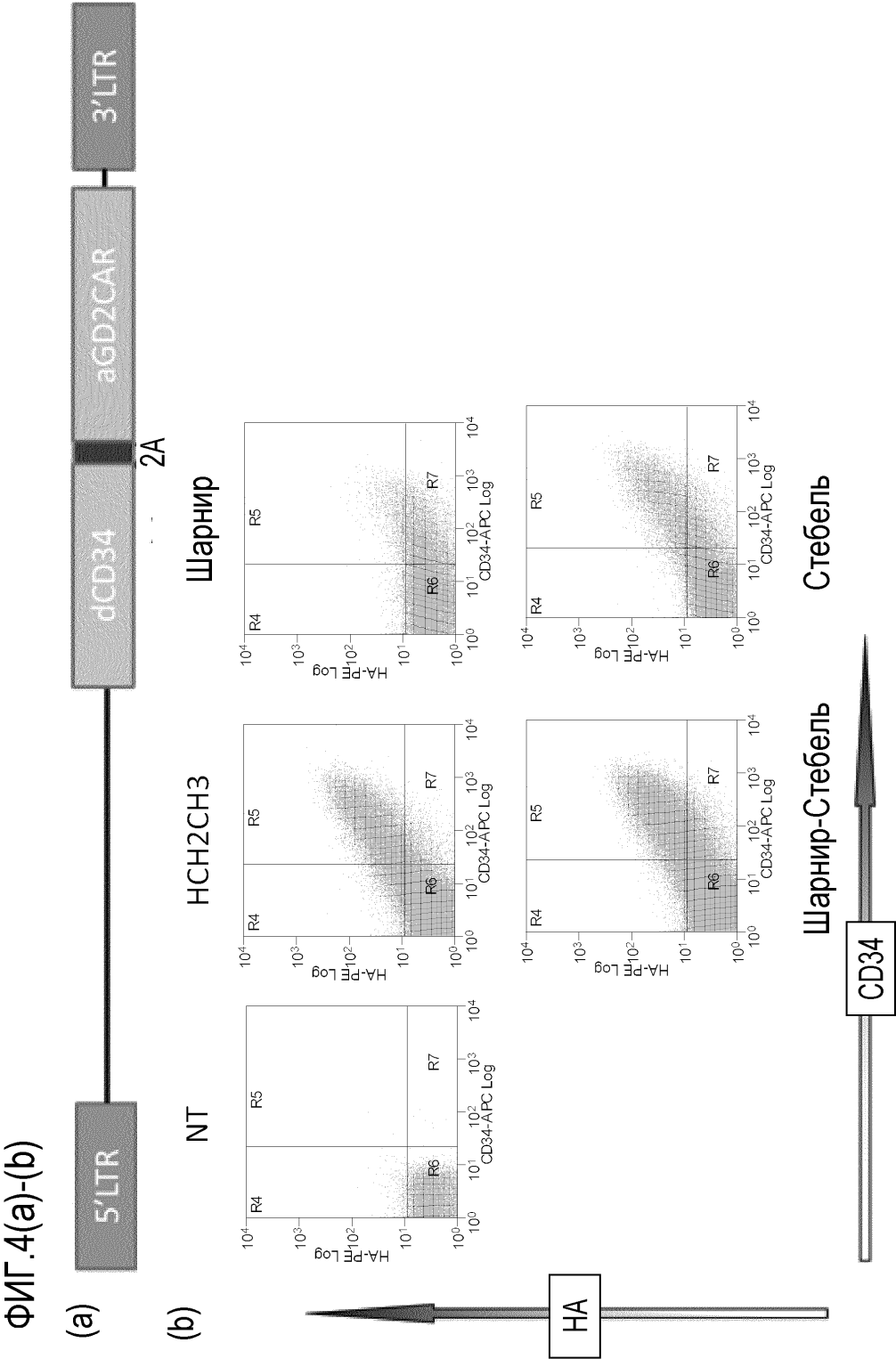


(e)



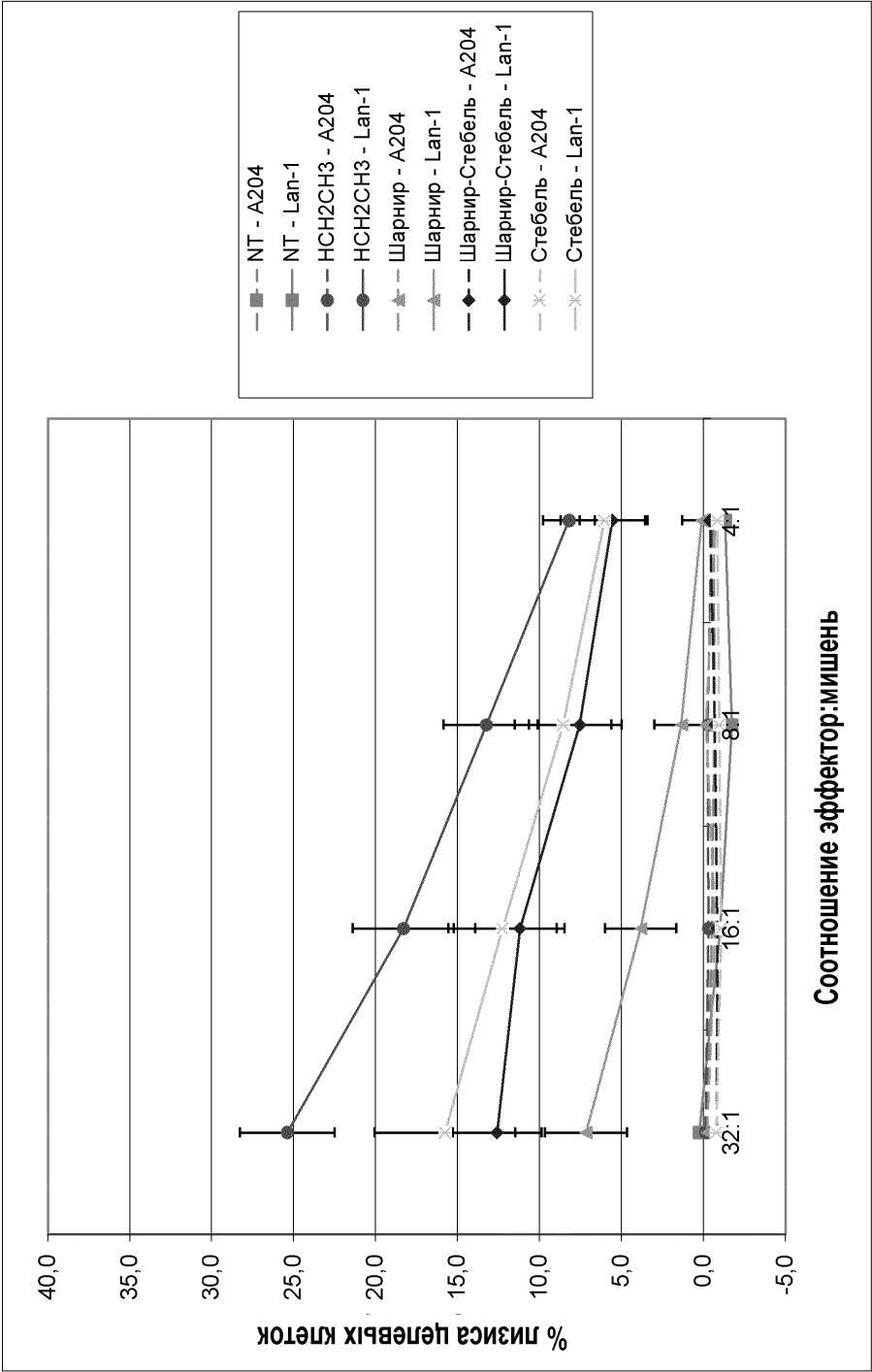
(f)



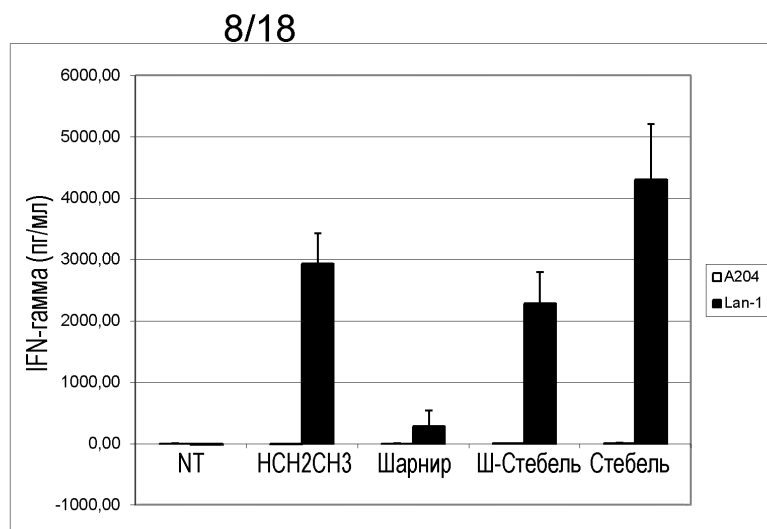


7/18

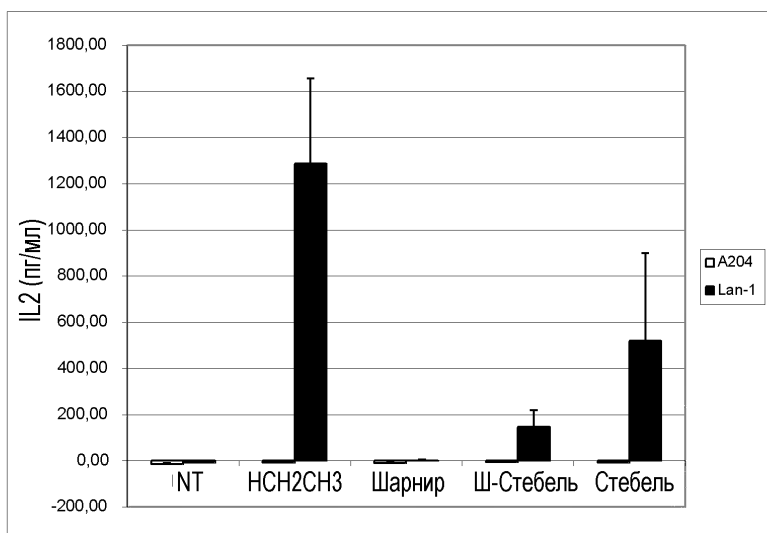
ФИГ.4(с)



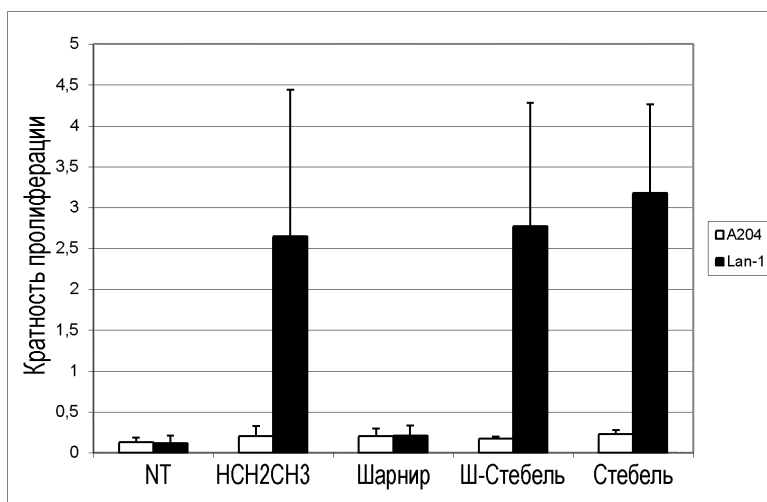
ФИГ.4(d)-(f)  
(d)



(e)

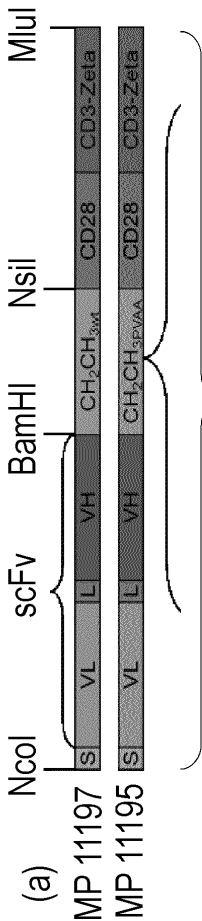


(f)



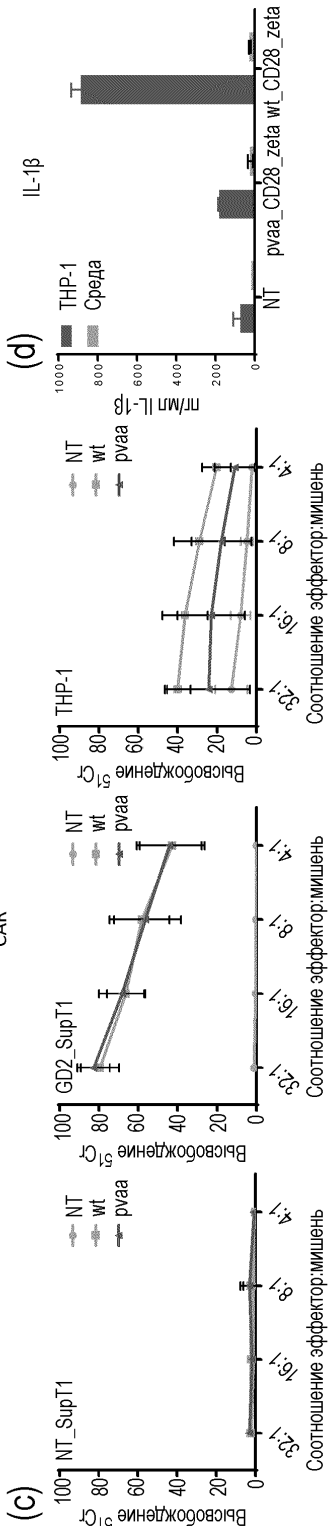
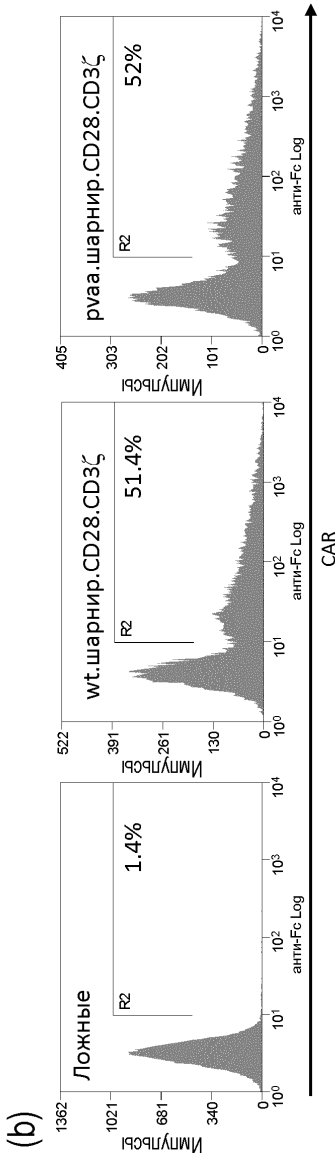


ФИГ.5

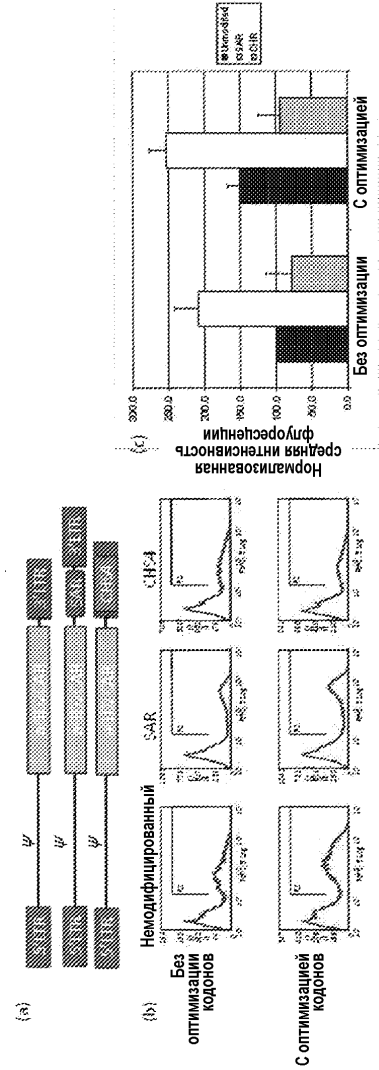


IgG1 Fc домен wt  
IgG1 Fc домен pvaа

PELLGG...ISR  
PPVA-G...ISR

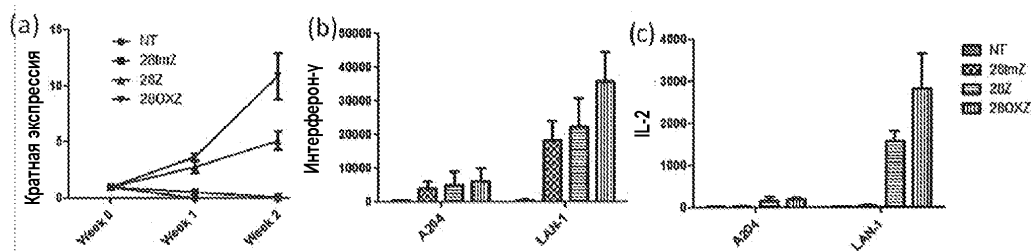


ФИГ.6

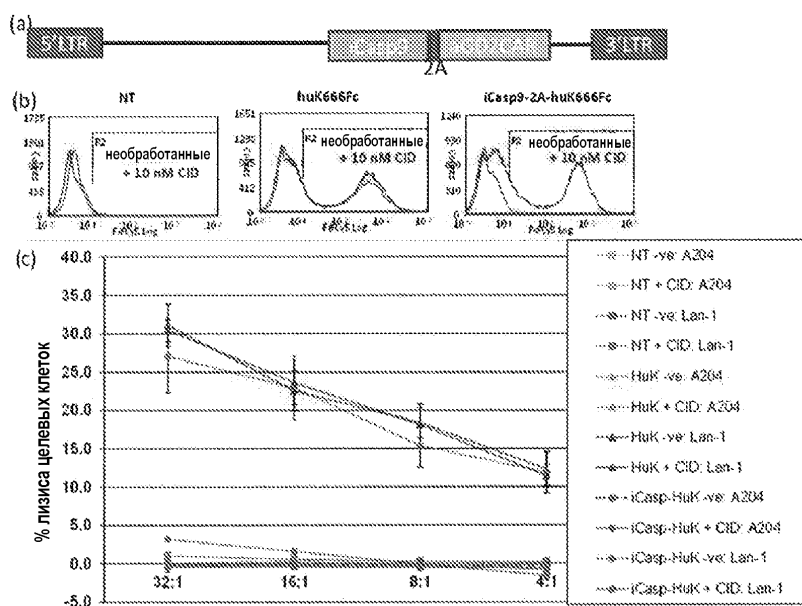


11/18

ФИГ.7

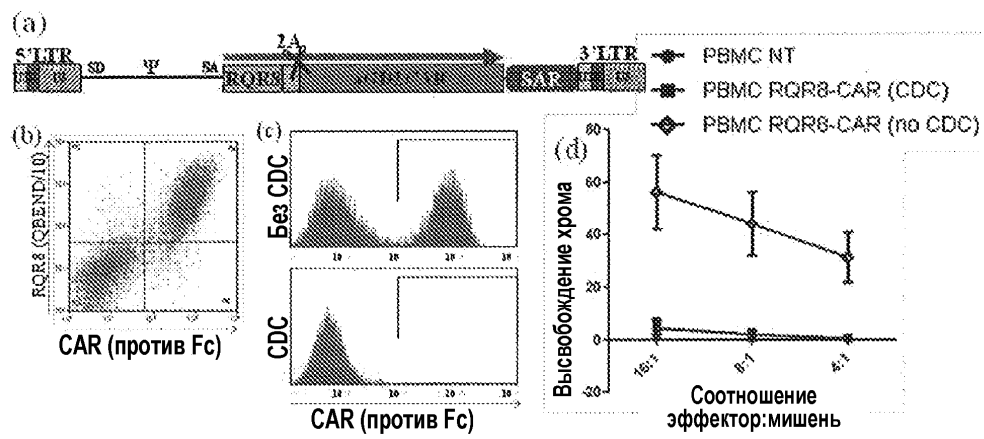


ФИГ.8

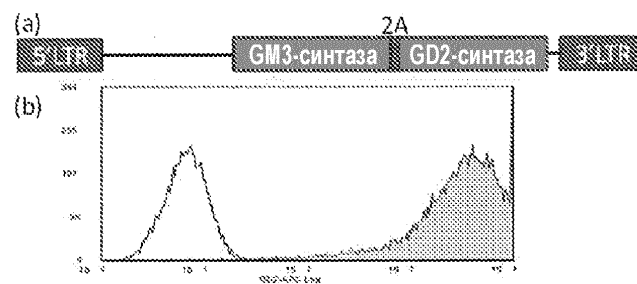


12/18

ФИГ.9

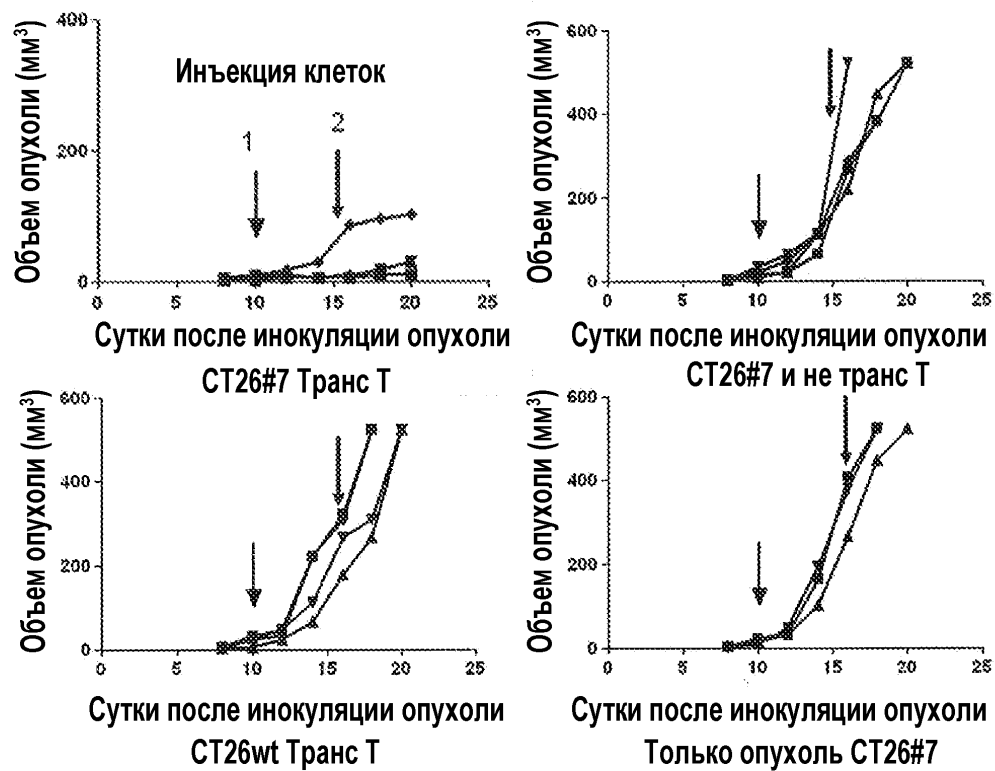


ФИГ.10



13/18

ФИГ.11



14/18

ФИГ.12

A.

MEITDTLLWVLLWVPGSTGQVQLKESGPLYVAFPSQTLSTCTVSGFSLASYNHWRQPPGKGLEWLGVIWAGGS  
 TNVNSALMSRLTISKDNKSKQVFLKMSITLADTAVYYCAKRSDDYSWFAYWGQSTLTVSSGGGGSGGGSGGGG  
 GSENVLTQSPSLASASVGDRTMTCRASSSVSSYLHWYQOKSGKAPKVIYSTENLASGVPSRFSGSGSGTDYTLT  
 ISSLPEDFATYYCQYSGYFITFGQGTKVEIKRSDP

FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFILFWV

SEKLLHSDYMMTTPREGPTREHVOFYAPPRTAASERDQELPHAKKPPGGGERTPIQEEQADAHSTLAKI  
 VETPSADAFAYCOQCHLHSDYMMTTPREGPTREHVOFYAPPRTAASERDQELPHAKKPPGGGERTPIQEEQADAHSTLAKI  
 SEKLLHSDYMMTTPREGPTREHVOFYAPPRTAASERDQELPHAKKPPGGGERTPIQEEQADAHSTLAKI

B.

MEITDTLLWVLLWVPGSTGQVQLKESGPLYVAFPSQTLSTCTVSGFSLASYNHWRQPPGKGLEWLGVIWAGGS  
 TNVNSALMSRLTISKDNKSKQVFLKMSITLADTAVYYCAKRSDDYSWFAYWGQSTLTVSSGGGGSGGGSGGGG  
 SENQMTQSPSLASASVGDRTMTCRASSSVSSYLHWYQOKSGKAPKVIYSTENLASGVPSRFSGSGSGTDYTLT  
 ISSLPEDFATYYCQYSGYFITFGQGTKVEIKRSDP

FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFILFWV

SEKLLHSDYMMTTPREGPTREHVOFYAPPRTAASERDQELPHAKKPPGGGERTPIQEEQADAHSTLAKI  
 VETPSADAFAYCOQCHLHSDYMMTTPREGPTREHVOFYAPPRTAASERDQELPHAKKPPGGGERTPIQEEQADAHSTLAKI  
 SEKLLHSDYMMTTPREGPTREHVOFYAPPRTAASERDQELPHAKKPPGGGERTPIQEEQADAHSTLAKI

C.

MEITDTLLWVLLWVPGSTGQVQLKESGPLYVAFPSQTLSTCTVSGFSLASYNHWRQPPGKGLEWLGVIWAGGS  
 TNVNSALMSRLTISKDNKSKQVFLKMSITLADTAVYYCAKRSDDYSWFAYWGQSTLTVSSGGGGSGGGSGGGG  
 SENQMTQSPSLASASVGDRTMTCRASSSVSSYLHWYQOKSGKAPKVIYSTENLASGVPSRFSGSGSGTDYTLT  
 ISSLPEDFATYYCQYSGYFITFGQGTKVEIKRSDP

FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFILFWV

SEKLLHSDYMMTTPREGPTREHVOFYAPPRTAASERDQELPHAKKPPGGGERTPIQEEQADAHSTLAKI  
 VETPSADAFAYCOQCHLHSDYMMTTPREGPTREHVOFYAPPRTAASERDQELPHAKKPPGGGERTPIQEEQADAHSTLAKI  
 SEKLLHSDYMMTTPREGPTREHVOFYAPPRTAASERDQELPHAKKPPGGGERTPIQEEQADAHSTLAKI

D.

MEITDTLLWVLLWVPGSTGQVQLKESGPLYVAFPSQTLSTCTVSGFSLASYNHWRQPPGKGLEWLGVIWAGGS  
 TNVNSALMSRLTISKDNKSKQVFLKMSITLADTAVYYCAKRSDDYSWFAYWGQSTLTVSSGGGGSGGGSGGGG  
 SENQMTQSPSLASASVGDRTMTCRASSSVSSYLHWYQOKSGKAPKVIYSTENLASGVPSRFSGSGSGTDYTLT  
 ISSLPEDFATYYCQYSGYFITFGQGTKVEIKRSDP

FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFILFWV

SEKLLHSDYMMTTPREGPTREHVOFYAPPRTAASERDQELPHAKKPPGGGERTPIQEEQADAHSTLAKI  
 VETPSADAFAYCOQCHLHSDYMMTTPREGPTREHVOFYAPPRTAASERDQELPHAKKPPGGGERTPIQEEQADAHSTLAKI  
 SEKLLHSDYMMTTPREGPTREHVOFYAPPRTAASERDQELPHAKKPPGGGERTPIQEEQADAHSTLAKI

E.

MEITDTLLWVLLWVPGSTGQVQLKESGPLYVAFPSQTLSTCTVSGFSLASYNHWRQPPGKGLEWLGVIWAGGS  
 TNVNSALMSRLTISKDNKSKQVFLKMSITLADTAVYYCAKRSDDYSWFAYWGQSTLTVSSGGGGSGGGSGGGG  
 SENQMTQSPSLASASVGDRTMTCRASSSVSSYLHWYQOKSGKAPKVIYSTENLASGVPSRFSGSGSGTDYTLT  
 ISSLPEDFATYYCQYSGYFITFGQGTKVEIKRSDP

FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFILFWV

SEKLLHSDYMMTTPREGPTREHVOFYAPPRTAASERDQELPHAKKPPGGGERTPIQEEQADAHSTLAKI  
 VETPSADAFAYCOQCHLHSDYMMTTPREGPTREHVOFYAPPRTAASERDQELPHAKKPPGGGERTPIQEEQADAHSTLAKI  
 SEKLLHSDYMMTTPREGPTREHVOFYAPPRTAASERDQELPHAKKPPGGGERTPIQEEQADAHSTLAKI

## ФИГ.12 продолжение

10

[illegible]

G.

```

03:
MEEDTELLLVYLLWVEGSGQVQVQLQESGPGLVKPSQTLISITCTVSGFSLASYNIHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGS
TNYNSALMSRLTISKDNKNGVFLKMSSLTAADTAVYYCARSDDDYWFAYWQGTLTVTVSGGGGSGGGSGGG
SENQMTQSPSSLASVGDVIMTKRSGSSVSSTLVWYQOKSGKAPKVIWYSTNLASGVPSRPSGGSGSGTDYTLT
ISSLPQEDFATYYCOQYSGYPITFGQCTKVEIKRSDP

```

H.

[illegible]

1

[illegible]

J.

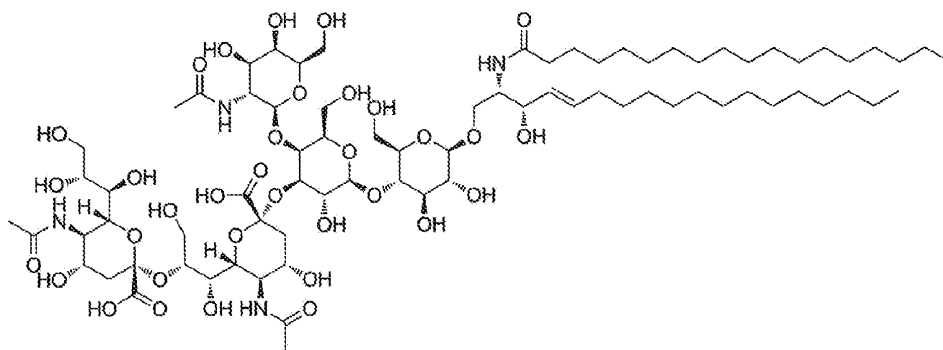
17.   
 ...METDTLLLVLLWVPGSTGQVQLQESGPGLVKPSQTLISITCTVSGFSLAS   
 YNIRWVROPFGKLEWLGVINAGGSTNYNSALMSRLTISKDNSKNQVFLKMSSLTAADTAVYYCAKRRDDYSWFAY   
 WCQGLTIVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSENQMTQSPKSLASVGVDRVMTCRASSVSSSYLHWYQKSKAPKVVWIIY   
 STSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYSGVPITFGQSTKVEIKRSDP   
 ...   
 ...FWVLVV   
 VGGVLACYSLLVYAFILFWV   
 ...

16/18

## ФИГ.12 продолжение

Область	Описание
Ген самоубийства	iCasp9 или RQR8
FMD-2A	Пептид 2A ящура
Сигнал	Сигнальный пептид
scFv1	scFv (muKM666 или huKM666)
SDP	Линкер и разрыв цепи
Спейсер	Стебель CD8 $\alpha$
CD28 ТМ	Трансмембранный домен CD28
CD28 эндо	Эндодомен CD28
OX40 эндо	Эндодомен OX40
CD3Z эндо	Эндодомен CD3 $\zeta$

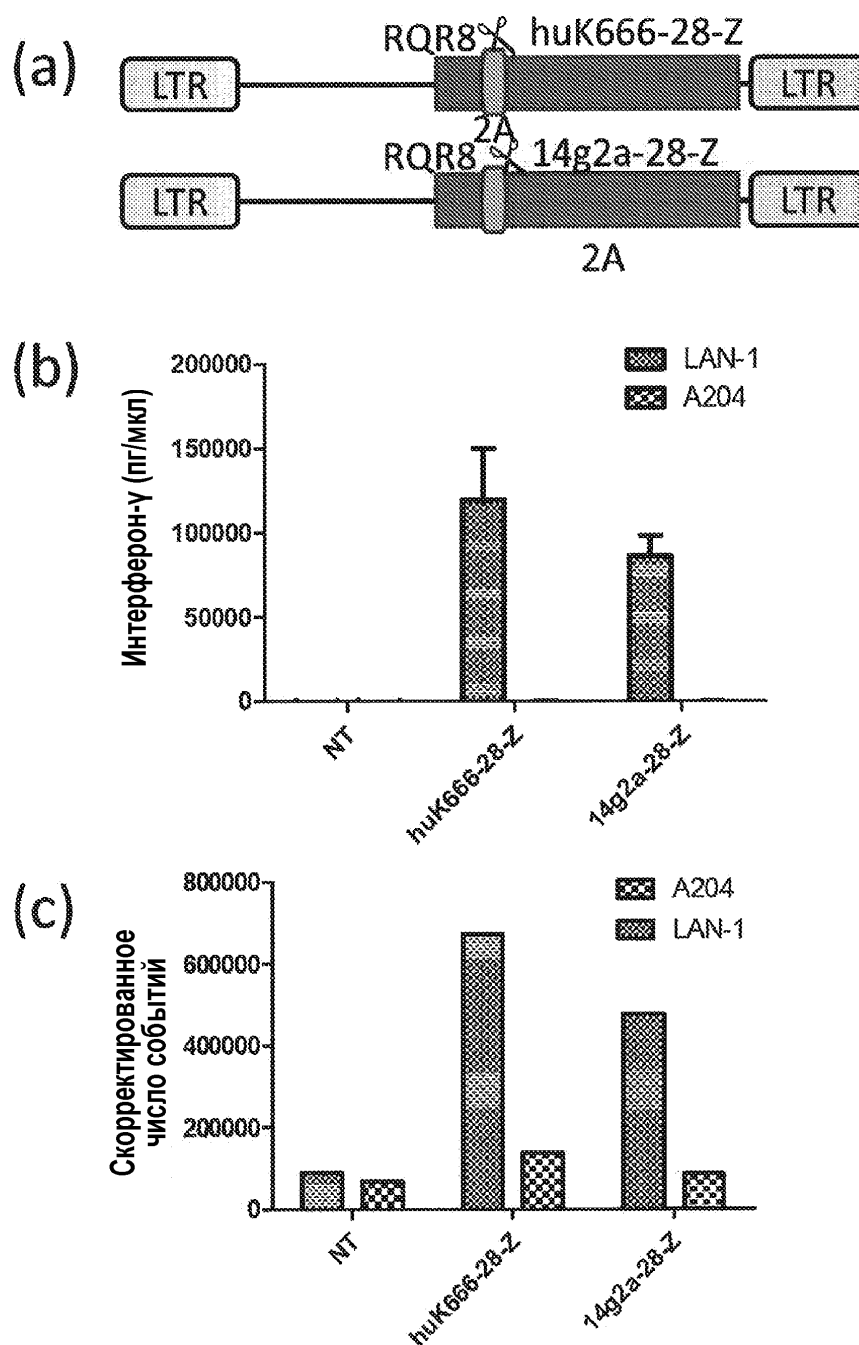
## ФИГ.13





17/18

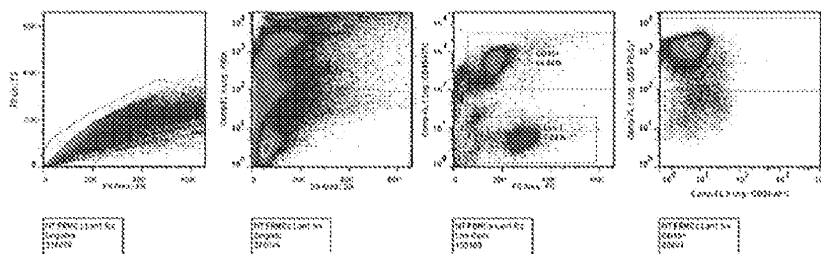
ФИГ.14



18/18

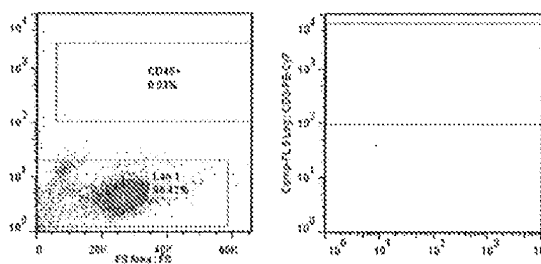
ФИГ.15

(a) Отдельные → Живые клетки → CD45+ → CD3+ vs CD34+



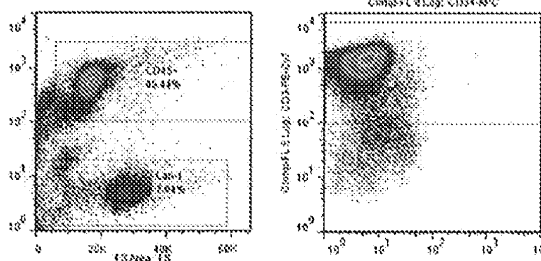
(b)

Только Lan1



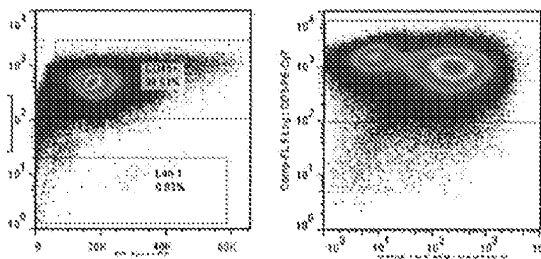
(c)

NT  
PBMC +  
Lan-1



(d)

HuK-28Zeta +  
Lan1



(e)

14g2a-28Zeta +  
Lan1v

