

RU 2685479 C2



(19) RU (11) 2 685 479<sup>(13)</sup> C2

(51) МПК  
*C07K 14/725 (2006.01)* *A61P 35/00 (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)*

## (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 дисиалоганглиозид (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-T-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.

Р У 2 6 8 5 4 7 9 C 2

(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.

Р У 2 6 8 5 4 7 9 C 2

<b>RUSSIAN FEDERATION</b>  <b>FEDERAL SERVICE FOR INTELLECTUAL PROPERTY</b>	<b>(19) RU (11) 2 685 479<sup>(13)</sup> C2</b> <b>(51) Int. Cl.</b> <i>C07K 14/725 (2006.01)</i> <i>A61P 35/00 (2006.01)</i> <i>C07K 19/00 (2006.01)</i> <i>C07K 16/30 (2006.01)</i> <i>C12N 5/0783 (2010.01)</i> <i>C12N 15/13 (2006.01)</i> <i>C12N 15/63 (2006.01)</i> <i>A61K 35/17 (2015.01)</i> <i>A61K 47/66 (2017.01)</i> <i>A61K 47/68 (2017.01)</i> <i>A61K 47/69 (2017.01)</i>
<b>(12) ABSTRACT OF INVENTION</b>	
<b>(52) CPC</b> <i>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)</i>	
<b>(21) (22) Application:</b> 2016138422, 06.03.2015 <b>(24) Effective date for property rights:</b> <b>06.03.2015</b>  <b>Registration date:</b> <b>18.04.2019</b>  <b>Priority:</b> <b>(30) Convention priority:</b> <b>06.03.2014 GB 1403972.1</b>  <b>(43) Application published:</b> 06.04.2018 Bull. № 10  <b>(45) Date of publication:</b> 18.04.2019 Bull. № 11  <b>(85) Commencement of national phase:</b> 06.10.2016  <b>(86) PCT application:</b> <b>GB 2015/050649 (06.03.2015)</b>  <b>(87) PCT publication:</b> <b>WO 2015/132604 (11.09.2015)</b>  <b>Mail address:</b> <b>129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"</b>	<b>(72) Inventor(s):</b> <b>PULE, Martin (GB),</b> <b>ANDERSON, John (GB),</b> <b>THOMAS, Simon (GB)</b>  <b>(73) Proprietor(s):</b> <b>UCL BUSINESS PLC (GB)</b>
<b>(54) CHIMERIC ANTIGENIC RECEPTOR</b> <b>(57) Abstract:</b> FIELD: medicine. SUBSTANCE: present invention relates to immunology. Disclosed is a chimeric antigenic receptor (CAR), which contains a disialoganglioside (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 дисиалоганглиозид (GD2). Т-клетки, экспрессирующие такой CAR, можно использовать в лечении злокачественных заболеваний, таких как нейробластома.

## ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Дисиалоганглиозид (GD2, PubChem: 6450346) представляет собой гликосфинголипид, 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 20 переключения изотипа на IgG2a (14g2a) и, наконец, после химеризации с IgG1 человека для того, чтобы формировать ch14.18. Это последнее антитело приводило к яркому эффекту в рандомизированном исследовании: US Children's Oncology Group сообщала о III фазе рандомизированного исследования ch14:18 у детей с высоким риском нейробластомы, которые достигли радиологической ремиссии после начального лечения. 25 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, 30 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. 35 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 40 подходах к лечению нейробластомы и других злокачественных опухолей, экспрессирующих GD2.

### Химерные антигенные рецепторы (CAR)

Химерные антигенные рецепторы представляют собой белки, которые в их обычном 45 формате, объединяют специфичность моноклонального антитела (mAb) с эффекторной функцией Т-клетки. Их обычной формой является трансмембранный доменный белок I типа с антигенраспознающим аминоконцом, спайсером, трансмембранным доменом, все соединены в составной эндодомен, который передает сигналы выживаемости и активации Т-клетки (см. фиг. 1а).

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 5 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 10 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 15 некоторую противоопухолевую активность, но не способны полностью устраниТЬ 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 зажимает белок в мембране и эндодомен передает сигналы. С (b) до (d): различные генерации и перестановки эндодоменов CAR: (b) начальные конструкции передавали 25 ITAM сигналы только через эндодомен Fc $\epsilon$ R1- $\gamma$  или CD3 $\zeta$ , тогда как более поздние конструкции передавали дополнительный (c) один или (d) два костимуляторных сигнала в цис.

Фиг. 2 - сконструированные варианты CAR против GD2 (a) CAR против GD2 с использованием антитела KM666 мыши в качестве scFv со спейсером IgG1 человека и 30 эндодоменом CD28-OX40- $\zeta$ ; (b) CAR против GD2 с использованием гуманизированного антитела huKM666 Nakamura в том же формате, что и (a); (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. (a) Экспрессия на Т-клетках периферической крови от 3 нормальных доноров; (b) средняя интенсивность флуоресценции этих графиков FACS, представленная в виде гистограммы; (c) анализ 40 высвобождения хрома с использованием нетрансдуцированных, трансдуцированных muKM666 и huKM666 Т-клеток в качестве эффекторов против мишени 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. (a) Ретровирусная конструкция, делающая возможной коэкспрессию 45 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 (а) введенные

- 5 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  
10 Fc с использованием клеточной линии THP-1, экспрессирующей FcR; высвобождение IL-1 $\beta$  клеточной линией THP-1 в ответ на нетрансдуцированные Т-клетки, Т-клетки с CAR с Fc дикого типа и мутантным Fc.

Фиг. 6 - оптимизация экспрессирующей кассеты

- (а) картирование оптимизации, которую осуществляли в кассете: SAR или CHS4; (b)  
15 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

- 20 Сравнивали три различных химерных антигенных рецептора. Все рецепторы состояли из huK666 scFv, Fc домена из IgG1, мутированного для того, чтобы снижать связывание FcR, и трансмембранный 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  
25 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  
30 GD2-положительной). Пролиферация и высвобождение цитокинов показывают, что активность рецепторов представляет собой 28tmZ < 28Z < 28OXZ.

Фиг. 8 - коэкспрессия с геном самоубийства iCasp9

- (а) Коэкспрессия iCasp9 с CAR против GD2 с использованием последовательности FMD-2A; (b) экспрессия CAR в NT Т-клетках, Т-клетках, трансдуцированных GD2CAR,  
35 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.

- 40 Фиг. 9 - коэкспрессия с геном самоубийства RQR8

- (а) 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.  
45 (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 - (а) Бицистронный вектор, экспрессирующий GM3-сигназу и GD2-сигназу.

(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

5 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

10 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)

15 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)

20 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)

25 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

30 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

35 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

40 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

45 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.

<sup>5</sup> 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.

Антитело к GD2 14g2a можно рассматривать в качестве золотого стандарта,

- <sup>10</sup> поскольку его используют в качестве терапевтического антитела и оно представляет собой единственный scFv, тестируемый 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.
- <sup>15</sup> Авторы изобретения обнаружили, что Т-клетки с huK666 CAR высвобождают больше IFN-γ, лучше пролиферируют и более полно уничтожают, чем 14g2a эквиваленты.

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

- <sup>20</sup> 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

- <sup>25</sup> 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).

- <sup>30</sup> 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)

- <sup>35</sup> 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.

- <sup>40</sup> 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.

- <sup>45</sup> GD2-связывающий домен и трансмембранный домен можно соединять с помощью спайсера.

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

Спайсер 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- $\zeta$ .

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

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.

Клетка может совместно экспрессировать CAR согласно первому аспекту изобретения 30 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.

В седьмом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения

40 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, кодирующую 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).

15 Экспрессирующая кассета может экспрессировать CAR согласно первому аспекту 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 QVQLKESGPVLVAPSQTLSITCTVSGFSLASYNIHWVRQPPGKGLEWLGVIAAGGST  
NYNSALMSRLSISKDNSKSQVFLQMNSLQTDDTAMYYCAKRSDDYSWFAYWGQGTLV  
TVSASGGGGSGGGGGGGSENVLTQSPAAMSASPGEKVTMTCRASSSVSSSYLHWYQ  
QKSGASPKVWIYSTSNLASGVPGRFSGSGSGTSYSLTISSVEAEDAATYYCQQYSGYPIT  
FGAGTKVEVKR

10 SEQ ID № 8 (последовательность гуманизированного KM666)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSITCTVSGFSLASYNIHWVRQPPGKGLEWLGVIAAGGST  
NYNSALMSRLTISKDNSKNQVFLKMSSLTAADTAVYYCAKRSDDYSWFAYWGQGTLV  
TVSSGGGGSGGGGGGGSENVMTQSPSSLSASVGDRVTMTCRASSSVSSSYLHWYQQ  
KSGKAPKVWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYSGYPITF

15 GQGTKVEIKR

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

SEQ ID № 9 (последовательность VH из KM666 мыши)

QVQLKESGPVLVAPSQTLSITCTVSGFSLASYNIHWVRQPPGKGLEWLGVIAAGGST  
20 NYNSALMSRLSISKDNSKSQVFLQMNSLQTDDTAMYYCAKRSDDYSWFAYWGQGTLV  
TVSA

SEQ ID № 10 (последовательность VH гуманизированного KM666)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSITCTVSGFSLASYNIHWVRQPPGKGLEWLGVIAAGGST  
NYNSALMSRLTISKDNSKNQVFLKMSSLTAADTAVYYCAKRSDDYSWFAYWGQGTLV  
25 TVSS

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

SEQ ID № 11 (последовательность VL из KM666 мыши)

ENVLTQSPAAMSASPGEKVTMTCRASSSVSSSYLHWYQQKSGASPKVWIYSTSNLAS  
30 GVPGRFSGSGSGTSYSLTISSVEAEDAATYYCQQYSGYPITFGAGTKVEVK

SEQ ID № 12 (последовательность VH гуманизированного KM666)

ENQMTQSPSSLSASVGDRVTMTCRASSSVSSSYLHWYQQKSGKAPKVWIYSTSNLAS  
SGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYSGYPITFGQGTLKVEIK

CAR по изобретению может содержать вариант последовательности, которая 35 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).

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

### ТРАНСМЕМБРАННЫЙ ДОМЕН

CAR по изобретению также может содержать трансмембранный домен, который 45 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

FWVLVVGGVLACYSLIVTVAFIIFWV

**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- $\zeta$ , который содержит 3 ITAM. Это передает активационный сигнал в Т-клетку после связывания антигена. CD3- $\zeta$  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- $\zeta$  для того, чтобы передавать пролиферативный сигнал/сигнал выживаемости или все три можно использовать вместе.

15 Эндодомен CAR по настоящему изобретению может содержать эндодомен CD28 и OX40 и CD3- $\zeta$  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)  
RSKRSRLLHSDYMNMTPRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAY  
SEQ ID № 15 (эндодомен CD40)  
RSRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI  
SEQ ID № 16 (эндодомен CD3 $\zeta$ )  
25 RSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLKDERRGRDPEMGGKPRRKN  
PQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL  
PPR  
SEQ ID № 17 (CD28Z)  
RSKRSRLLHSDYMNMTPRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQ  
30 GQNQLYNELNLGRREYDVLKDERRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAY  
SEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR  
SEQ ID № 18 (CD28OXZ)  
RSKRSRLLHSDYMNMTPRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRDQRLPPDAHKPPGG  
35 GSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDR  
RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLS  
TATKDTYDALHMQALPPR

40 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 домен/внутриклеточный домен Т-клеточной сигнализации.

**СИГНАЛЬНЫЙ ПЕПТИД**

45 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 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 5 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 -

10 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.

15 SEQ ID № 19: METDTLLWVLLLWVPGSTG

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

### СПЕЙСЕР

20 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.

25 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 30 связывания Fc.

Примеры аминокислотных последовательностей для этих спейсеров приведены далее:

SEQ ID № 20 (шарнир-CH2CH3 из IgG1 человека):

AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDEPEV

35 KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP  
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQOPEN  
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
KD

SEQ ID № 21 (стебель CD8 человека):

40 TTPAPRPPPTAPTIAQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDI

SEQ ID № 22 (шарнир IgG1 человека):

AEPKSPDKTHTCPPCPKDPK

SEQ ID № 23 (шарнир-Fc IgG1):

AEPKSPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEPEV

45 KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP  
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQOPEN  
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
KD

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

5 AEPKSPDKTHCPPCPAPPVA\*GPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPE  
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL  
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE  
NNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG  
KKDPK

Модифицированные остатки подчеркнуты; \* обозначает делецию.

GD2

10 GD2 представляет собой дисиалоганглиозид, 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.

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

#### ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

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

20 Последовательность нуклеиновой кислоты может быть способна кодировать CAR, 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 taaaaagaccc cacctgtagg tttggcaagc tagcttaagt aacgccattt tgcaaggcat ggaaaaatac  
>..... LTR.....>

71 ataaactgaga atagaaaagt tcagatcaag gtcaggaaca gatggAACAG ctgaatatgg gccaaacagg  
>..... LTR.....>

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

211 acaggatate tgtggtaage agttctgcc ecggctcagg gccaagaaca gatggcccc agatggcgtc  
>..... LTR.....>

281 cagccctcag cagttcttag agaaccatca gatgttcca gggtgccccca aggacctgaa atgaccctgt  
>..... LTR.....>

10 351 gccttatttg aactaaccaa tcagttcgct tctcgattct gtteggcgcc ttatgctccc cgagctcaat  
>..... LTR.....>

421 aaaagagccc acaaccctc actcggggcg ccagtcctcc gattgactga gtcgccccgg taccctgtta  
>..... LTR.....>

491 tccaataaac cctcttgcag ttgcatccga ctgtggctcgatgttact tggggggc tcctctgagt  
>..... LTR.....>

15 561 gattgactac ccgtcagcgg gggctttca tttggggct cgtccggat cgggagaccc ctgcccagg  
>..... LTR.....>>

631 accaccgacc caccacccggg aggttaagctg gccagcaact tatctgtgtc tgtccgattt tctagtgtct

20 701 atgactgatt ttatgcgcct gcgtcggtac tagttagcta actagctotg tatctggcgg acccgtggtg  
Eco52I  
-----

771 gaactgacga gttcggaaaca cccggccgca accctggag acgtcccagg gacttcgggg gccgttttg

PshAI  
-----

25 841 tggcccgacc tgagtctaa aatcccgatc gtttaggact ctgggtgca cccccccttag aggagggata

911 tgggttctg gtaggagacg agaacctaaa acagttcccg cttccgtatg aattttgttcttgg

981 gaccgaagcc ggcggcgccgcttgc tgcagcatcg ttctgtgttgc actgtgtttc

SrfI  
-----

30 1051 tggatgtc tgaaaatatg ggcggggctt acgttccgtatc cactccctta agtttgcgtt tagtcaactg

1121 gaaagatgtc gagcggatcg ctcacaacca gtcggtagat gtcaagaaga gacgttgggt taccttctgc

1191 tctgcagaat ggcacaccc ttacgtcgga tggcccgccgac acggcacctt taaccgagac ctcacaccc

1261 aggttaagat caaggtctt tcaactggcc cgcgtggaca cccagaccag gtgggttaca tcgtgaccc

35 1331 ggaagccttg gttttgacc cccctccctg ggtcaagccc tttgtacacc ctaagccctcc gcctccctt

1401 cctccatcccg cccctgtctt ccccttgaa ctcctcgatcg acgttccgtt ctttatccag

BglII  
-----

1471 ccctcactcc ttctcttaggc gccccatat ggcctatgtac gatcttataat ggggcaccccg cgcggcttgc

40 1541 aaactccctt gaccctgaca tgacaagagt tactaacagc ccctctctcc aagctcactt acaggcttc

AgeI  
-----

1611 tacttagtcc agcacgaagt ctggagaccc ctggcgccag cctaccaaga acaactggac cgaccgggtgg

1681 tacctcaccc ttaccgagtc ggcgacacag tgggttccg ccgacaccag actaagaacc tagaacctcg

45

## AccI

1751 ctggaaagga ccttacacag tcctgtgtac cacccccacc gcctcaaag tagacggcat cgcaagttgg

## PmlI

5 1821 atacacccg cccacgtgaa ggctgtccgac cccgggggtg gaccatcctc tagactgcca acatggcac  
>..orf..>  
>..RQR8..>10 1891 cagcctgtcg tgctggatgg ccctgtgact gctggcgcc gaccacgccc atgcctgccc ctacagcaac  
>.....orf.....>  
>.....RQR8.....>1961 cccagcctgt gcagcggagg cggcgccagc gagctgccc cccagggcac cttctccaac gtgtccacca  
>.....orf.....>  
>.....RQR8.....>15 2031 acgtgagccc agccaagccc accaccaccc cctgttctta ttccaatctt tccctgtgtt gcgagggggg  
>.....orf.....>  
>.....RQR8.....>2101 aggcaagccc gccccagac ctccccaccc agccccacc atcgccagcc agcctcttag cctgagaccc  
>.....orf.....>  
>.....RQR8.....>20 SgrAI  
-----  
2171 gaggcctgcc gcccagccgc cggcgccgccc gtgcacacca gaggccttggaa ttccgcctgc gatatctaca  
>.....orf.....>  
>.....RQR8.....>

## BclI

25 2241 tctggggccc actggccggc acctgtggcg tgctgtgtc gagcctgtgtt atcaccctgt actgcaacca  
>.....orf.....>  
>.....RQR8.....>30 2311 ccgcaaccgc aggccgtgt gcaagtgccc caggccgtg gtgagagccg agggcagagg cagccctgt  
>.....orf.....>  
>.....RQR8.....>>.....FMD-2A.....>

## NcoI

35 2381 acctgcggcg acgtggagga gaaccaggc cccatggaga cccacacccct gctgtgtgg gtgtgtgtc  
>.....orf.....>  
>.....FMD-2A.....>>.....CAR.....>2451 tgtgggtgcc aggccgcacc gcccagggtgc agctgcggaa gtctggccca ggcctggta agcccaggca  
>.....orf.....>  
>.....CAR.....>2521 gaccctgagc atcacctgca ccgtgagccgg ctccagccctg gccagctaca acatccactg ggtgcggcag  
>.....orf.....>  
>.....CAR.....>40 2591 cccccaggca agggccttggaa gtgggtggc gtgtatctggg ctggcgccag caccaactac aacagcggccc  
>.....orf.....>  
>.....CAR.....>2661 tgatgagccg gctgaccatc agcaaggaca acagaagaa ccaggttgc ctgaagatga gcagccgtac  
>.....orf.....>  
>.....CAR.....>45 2731 agccgcgcac accgcgtgtt actactgcgc caagcggaggc gacgactaca gctgggtcgc ctactggggc  
>.....orf.....>  
>.....CAR.....>

2801 cagggcaccc tggtgaccgt gagctctggc ggaggcggct ctggcgagg cggctctggc ggaggcggca  
>..... orf.....>  
>..... CAR.....>

2871 gcgagaacca gatgacccag agcccccagca gcttgagcgc cagcgtggc gacccgggtga ccatgacctg  
>..... orf.....>  
>..... CAR.....>

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

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

3081 ccgactacac cctgaccate agcagcctgc agcccgaggat cttccacc tactactgcc agcagttacag  
>..... orf.....>  
>..... CAR.....>

BamHI

3151 cggctacccc atcaccttcg gecagggcac caagggtggat atcaagcggt cggatcccgc cgagcccaa  
>..... orf.....>  
>..... CAR.....>

FseI

3221 ttccttgaca aaactcacac atgcccaccc tgcccgacac ctccctggc cggcccgatca gtcttcctct  
>..... orf.....>  
>..... CAR.....>

3291 tccccccaaa acccaaggac accctcatga tcgccccggac ccctgaggatc acatgcgtgg tgggtggacgt  
>..... orf.....>  
>..... CAR.....>

3361 gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtaatgtg gacggcgatgg aggtgcataa tgccaagaca  
>..... orf.....>  
>..... CAR.....>

SacII

3431 aagccgcggg aggaggatca caacagcagc taccgtgtgg tcagcgtctt caccgtctt caccaggact  
>..... orf.....>  
>..... CAR.....>

3501 ggctgaatgg caagggtac aagtgcaggat tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat  
>..... orf.....>  
>..... CAR.....>

3571 ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acagggttac accctgcccc catccggga tgagctgacc  
>..... orf.....>  
>..... CAR.....>

3641 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggc aaaggcttct atcccgatca catcgccgtg gagtgggaga  
>..... orf.....>  
>..... CAR.....>

3711 gcaatggca acggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgtggac tccgacggat ctttttact  
>..... orf.....>  
>..... CAR.....>

Ppu10I

3781 ctacagcaag ctcacccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggAACGTCT tctcatgtct cgtgtatgt  
>..... orf.....>  
>..... CAR.....>

NsII

BfrBI

3851 gaggccctgc acaatcacta tacccagaaa tctctgatgtc tgatccagg caagaaggac cccaaatgttct  
>..... orf.....>

Van91I

>.....CAR.....>

3921 gggtcctggt ggtggggaa ggctgtctgg cctgttactc tcttcgttg accgtggact tcacatcattt  
>.....orf.....>  
>.....CAR.....>

5 3991 ctgggtgcgc tccaaagagga gcaggctct gcacagtgcac tacatgaaca tgactccccg ccgccccggg  
>.....orf.....>  
>.....CAR.....>

4061 cccacccgca agcattacca gcccattatgcc ccaccacgcg acttgcgcgc ctatcgctcc cgggtgaagt  
>.....orf.....>  
>.....CAR.....>

10 4131 tctctcgctc tgccgatgcc ccagcctatc agcagggcca gaatcagctg tacaatgaac tgaacctggg  
>.....orf.....>  
>.....CAR.....>

4201 caggcgggag gagtacgacg tgctggataa gcccggggc agagaccccg agatgggggg caaaccacgg  
>.....orf.....>  
>.....CAR.....>

15 4271 cgcaaaaatc cccaggaggg actctataaac gagctgcaga aggacaaaat ggccgaggcc tattccgaga  
>.....orf.....>  
>.....CAR.....>

4341 tcggcatgaa gggagagaga agacgcggaa agggccacga cggcctgtat cagggattgt ccaccgctac  
>.....orf.....>  
>.....CAR.....>

20 MluI ClaI  
-----

4411 aaaagataca tatgatgccc tgcacatgca ggcctgcca cccagatgac gcgtatcgat actgttctca  
>.....orf.....>>  
>.....CAR.....>>..SAR..>

25 4481 tcacatcata tcaaggttat ataccatcaa tattgccaca gatgttactt agcctttaa tatttctcta  
>.....SAR.....>

4551 atttagtgtat tatgcaatga tagttctctg atttctgaga ttgagttct catgtgtaat gattatttag  
>.....SAR.....>

4621 agtttctctt tcatctgttc aaattttgt ctatgtttat ttttactga tttgtaaagac ttcttttat  
>.....SAR.....>

30 4691 aatctgcata ttacaattct cttaactggg gtgttgcaaa tattttctgt cattctatgg cctgactttt  
>.....SAR.....>

4761 cttaatggtt ttttaatttt aaaaataagt cttaatattc atgcaatcta attaacaatc ttttctttgt  
>.....SAR.....>

SphI  
-----

35 4831 ggttaggact ttgagtcata agaaattttt ctctacactg aagtcatgat ggcatgttc tatattttt  
>.....SAR.....>

4901 tctaaaagat ttaaagtttt gcttctcca ttttagactta taattctactg gaattttttt gtgtgtatgg  
>.....SAR.....>

4971 tatgacatata gggttccctt ttattttttata catataaata tatttccctg tttttctaaa aaagaaaaag  
>.....SAR.....>

40 5041 atcatcattt tcccatgtat aatgccata tttttttcat aggtcaactt catatataaa tgggtctgtt  
>.....SAR.....>

5111 tctgagctct actctatttt atcagcctca ctgtctatcc ccacacatct catgctttgc tctaaatctt  
>.....SAR.....>

5181 gatatttagt ggaacattct ttccttattt gttctacaag aatatttttgg tattgtctt tggctttct  
>.....SAR.....>

45 5251 atatacattt tgaaatgagg ttgacaagtt cggatttagtc caatttggta aagacaggat atcagtggtc  
>.....SAR.....>>

5321 caggctctag ttttactca acaatatcac cagctgaagc ctatagagta cgagccatag ataaaataaa

```

5391 agattttatt tagtctccag aaaaaggggg gaatgaaaga ccccacctgt aggttggca agctagctta
      >>.....LTR.....>

5461 agtaacgcca ttttgcagg catggaaaa tacataactg agaatagaga agttcagatc aaggtcagga
      >.....LTR.....>

5 5531 acagatggaa cagctgaata tggccaaac aggatatctg tggtaaggag ttccctgcccc ggctcagggc
      >.....LTR.....>

10 5601 caagaacaga tggAACAGCT gaatatgggc caaacaggat atctgtgta agcagttctt gccccggctc
      >.....LTR.....>

5671 agggccaaga acagatggtc cccagatgcg gtccagccct cagcagttc tagagaacca tcagatgtt
      >.....LTR.....>

15 5741 ccagggtgcc ccaaggacct gaaatgaccc tgccttat ttgaactaac caatcagtcc gcttcgcct
      >.....LTR.....>

5811 tctgttcgag cgcttctgtc ccccgagctc aataaaagag cccacaaccc ctcactcggg gggccagtc
      >.....LTR.....>

5881 tccgattgac tgagtcgccc gggtacccgt gtatccaata aaccctcttg cagttgcatac cgacttgtgg
      >.....LTR.....>

5951 tctcgctgtt cttggagg gtctcctctg agtggattgac taccctgtcag cgggggtctt tcac
      >.....LTR.....>>

```

20 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 25 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 30 является желаемым. Гены самоубийства представляют собой генетически кодируемые механизмы, которые ведут к избирательному разрушению инфицированных 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 35 высокоэффективный ген самоубийства. Однако предварительно сформированный иммунный ответ может ограничивать ее использование в клинической ситуации существенной иммуносупрессии, такой как трансплантация гаплоидентичных стволовых клеток. Индуциальная каспаза 9 (iCasp9) представляет собой ген самоубийства, сконструированный посредством замены активирующего домена каспазы 9 на 40 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 45 внутриклеточные белки, так что при использовании в качестве единственного трансгена, их следует экспрессировать совместно с маркерным геном для того, чтобы сделать возможным отбор трансдудированных 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

MLEGVQVETISPGDGRTPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSRDRNPKFKMLGKQ

5 EVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIPPPHATLVFDVELLKLESGGGS  
GVDGFGDVGALLESLRGNADLAYILSMEPCGHCLIINNVNCRESGLRTGNSIDCEKLR  
RRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPG  
AVYGTGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESP  
GSNPEPDATPFQEGLRTFDQLDAISSLPTSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDD

10 IFEQWAHSEDLQSLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSAS

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

MGTSLLCWMALCLLGADHADACPYSNPSLCGGGGSELPTQGTFSNVSTNVSPAKP

20 TTTACPYSNPSLCGGGGSPAPRPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAHTRGLDFAC  
DIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVV

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.

35 Вектор также может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, 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 5 фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или эксквиентом 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

10 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 15 периферической крови пациента (первая сторона) или в ситуации трансплантата гематопоэтических стволовых клеток из периферической крови донора (вторая сторона) или из периферической крови от несвязанного донора (третья сторона). Альтернативно, 20 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.

25 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 30 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 35 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 нукleinовой кислоты, кодирующей GM3-синтазу, и нукleinовой кислоты, кодирующей GD2-синтазу, в клетку.

40 Нукleinовую кислоту можно вводить, например, посредством трансфекции или трансдукции, с использованием вектора, такого как плазмида или вирусный вектор.

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

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

Клетка может быть из клеточной линии.

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

Далее изобретение дополнительно описано в виде примеров, которые предназначены помочь специалисту в данной области при осуществлении изобретения и не

5 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

10 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 15 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

20 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 яшура для того, чтобы сделать возможным точное сравнение (фиг. 4a). Кроме того, scFv huK666 помечали аминоконцевой меткой HA для того, чтобы сделать 25 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 30 мишеням сравнивали с использованием анализа высвобождения хрома. Он демонстрировал эффективность уничтожения в следующем порядке: Fc > шарнир-стебель=стебель > шарнир (фиг. 4c).

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

35 Высвобождение интерферона- $\gamma$  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 е).

Наконец, пролиферацию CAR Т-клеток сравнивали, когда CAR Т-клетки 40 стимулировали GD2-положительными или -отрицательными мишенями. Пролиферацию обнаруживали в следующем порядке: стебель, шарнир-стебель, Fc, шарнир (фиг. 4d и е)

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 45 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(с)). Наконец, показано, что эти мутации оказывали желаемый эффект в отношении неспецифичного уничтожения FcR-экспрессирующих мишней (моноцитоидная линия, называемая THP1) и высвобождения IL-1 $\beta$  этими моноцитами (фиг. 5е).

5 Пример 4 - Оптимизация экспрессирующей кассеты

Ввиду оптимизации экспрессии рецептора тестировали следующее: (а) включение области прикрепления каркаса (SAR) в кассету; (б) включение инсулятора хроматина  $\beta$ -гемоглобина курицы (CHS4) в 3'LTR и (с) оптимизацию кодонов открытой рамки считывания (фиг. 6а). Показано, что включение SAR усовершенствовало свойства 10 экспрессии, как делала оптимизация кодонов, тогда как CHS4 оказывал небольшой эффект (фиг. 6б). Объединение SAR и оптимизации кодонов аддитивно усовершенствовало экспрессию (фиг. 6с)

Пример 5 - Сравнение различных эндодоменов

Создавали конструкции с тремя различными эндодоменами: трансмембранный домен

15 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. 8а - CAR был в формате Fc-спейсера, CD28OXZ выбирали произвольно, чтобы продемонстрировать функцию). CAR мог быть хорошо экспрессирован, несмотря на коэкспрессию с iCasp9 (фиг. 8б). Активация iCasp9 с использованием низкомолекулярного 25 димеризатора вела к удалению CAR положительных Т-клеток (фиг. 8б). Т-клетки iCasp9-GD2CAR, которые подвергали воздействию этого димеризатора, теряли свою GD2-специфичность, когда на них воздействовал димеризатор (фиг. 8с).

Пример 7 - Коэкспрессия с геном самоубийства RQR8

CAR против GD2 совместно экспрессировали с геном самоубийства наподобие RQR8

30 (фиг. 9а - CAR был в формате Fc-спейсера, CD28Z выбирали произвольно для того, чтобы продемонстрировать функцию). Было возможно совместно экспрессировать рецептор и CAR (фиг. 9б). Активация функции гена самоубийства RQR8 с использованием ритуксимаба и комплемента приводила к удалению трансдуцированных Т-клеток и утрате распознавания GD2 (фиг. 9 с и д).

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 40 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 CD26 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-

5 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  
10 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 15 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.

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

Ретровирусы получали посредством временной трансфекции клеток 293T плазмидами, кодирующими GD2 CAR, gag/pol и оболочечный белок RD114. После 3 суток супернатанты собирали и использовали для того, чтобы трансдуцировать PHA/IL-2- 25 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- $\zeta$ . Через шесть суток после трансдукции CAR-экспрессию подтверждали с помощью 30 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 35 анализировали на уровень интерферона- $\gamma$  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- $\gamma$ . Показано, что Т-клетки с huK666 CAR продуцируют больше IFN- $\gamma$  (фиг. 14b). После одной недели Т-клетки считали и было показано, что huK666 CAR имеет более высокую пролиферацию (фиг. 14c).

40 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.

45 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

5 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

10 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.

15 (57) Формула изобретения

1. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий:

15 i) дисиалоганглиозид (GD2)-связывающий домен, который содержит

20 а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую VH домен, который имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, и

25 б) 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.

20 2. CAR по п.1, в котором GD2-связывающий домен содержит последовательность, которая представлена в SEQ ID NO: 8.

25 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.

30 4. CAR по п.1, в котором GD2-связывающий домен и трансмембранный домен соединены с помощью спейсера.

35 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.

35 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.

35 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- $\zeta$ .

40 11. CAR по п.10, в котором внутриклеточный домен передачи Т-клеточных сигналов содержит все из следующих эндодоменов: эндодомен CD28; эндодомен OX40 и CD3- $\zeta$ .

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.

45 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 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 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 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.

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

## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

&lt;110&gt; UCL Business PLC

&lt;120&gt; ХИМЕРНЫЙ АНТИГЕННЫЙ РЕЦЕПТОР

&lt;130&gt; P103293PCT

&lt;150&gt; 1403972.1

&lt;151&gt; 2014-03-06

&lt;160&gt; 37

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR1 вариабельной области тяжелой цепи

&lt;400&gt; 1

Ser Tyr Asn Ile His

1 5

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR2 вариабельной области тяжелой цепи

&lt;400&gt; 2

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

1 5 10 15

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR3 вариабельной области тяжелой цепи

&lt;400&gt; 3

Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; Белок

<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 Ser Gly Gly Gly Gly  
 115 120 125

Ser 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 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 КМ666

&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	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
				115			120			125				

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	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
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

225 230 235 240

Lys Arg

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

<220>  
 <223> Последовательность VH КМ666 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 VH гуманизированного КМ666

<400> 10

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

65	70	75	80
----	----	----	----

Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Pro
									85						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 Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu

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 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	80
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

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  
 130 135 140 145

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-CH2CH3 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

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> Спайсер 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> Спайсер 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> Спайсер 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> Спайсер 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

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 ttggcaagc tagcttaagt aacgccattt tgcaaggcat

60

ggaaaaatac	ataactgaga	atagaaaagt	tcagatcaag	gtcaggaaca	gatggAACAG
120					
ctgaatatgg	gccaacagg	atatctgtgg	taagcagttc	ctgccccggc	tcagggccaa
180					
gaacagatgg	aacagctgaa	tatggccaa	acaggatatc	tgtggtaa	agttcctgcc
240					
ccggctcagg	gccaagaaca	gatggtccc	agatgcggc	cagccctcag	cagtttctag
300					
agaaccatca	gatgttcca	gggtgcccc	aggacctgaa	atgaccctgt	gccttatttg
360					
aactaaccaa	tcagttcgct	tctcgcttct	gttcgcgcgc	ttatgctccc	cgagctcaat
420					
aaaagagccc	acaaccctc	actcggggcg	ccagtctcc	gattgactga	gtcgcccg
480					
tacccgtgt	tccaataaac	cctcttgcag	ttgcattccga	cttgggtct	cgctgttcct
540					
tgggagggtc	tcctctgagt	gattgactac	ccgtcagcgg	gggtcttca	tttggggct
600					
cgtccggat	cgggagaccc	ctgcccagg	accaccgacc	caccaccgg	aggtaagctg
660					
gccagcaact	tatctgtgtc	tgtccgattt	tctagtgtct	atgactgatt	ttatgcgcct
720					
gcgtcggta	tagttagcta	actagctctg	tatctggcgg	accctgggt	gaactgacga
780					
gttcggaaca	cccgccgca	accctggag	acgtcccagg	gacttcggg	gccgttttg
840					
tggcccgacc	tgagtctaa	aatcccgatc	gtttaggact	cttggtgca	cccccccttag
900					
aggagggata	tgtggttctg	gtaggagacg	agaacctaaa	acagttcccg	cctccgtctg
960					
aattttgt	ttcggttgg	gaccgaagcc	gcgcgcgc	tcttgtctgc	tgcagcatcg
1020					
ttctgtgtt	tctctgtctg	actgtgttcc	tgtatttgc	tgaaaatatg	ggcccggt
1080					
agcctgttac	cactccctta	agtttgacct	taggtcactg	gaaagatgtc	gagcggatcg
1140					
ctcacaacca	gtcggtagat	gtcaagaaga	gacgttgggt	taccttctgc	tctgcagaat
1200					
ggccaacctt	taacgtcgga	tggccgcgag	acggcacctt	taaccgagac	ctcatcaccc

1260

aggttaagat 1320	caaggtcttt	tcacctggcc	cgcacatggaca	cccagaccag	gtggggtaca
tctgtacacctg 1380	ggaagccttg	gcttttgacc	cccctccctg	ggtaagccc	tttgtacacc
ctaaggcctcc 1440	gcctcccttt	cctccatccg	ccccgtctct	cccccttgaa	cctcctcgtt
cgtaccccgcc 1500	tcgatcctcc	ctttatccag	ccctcactcc	ttctcttaggc	ccccccatat
ggccatatatga 1560	gatcttatat	ggggcacccc	cgccccttgt	aaacttccct	gaccctgaca
tgacaagagt 1620	tactaacagc	ccctctctcc	aagctcactt	acaggctctc	tacttagtcc
agcacgaagt 1680	ctggagacct	ctggcggcag	cctaccaaga	acaactggac	cgaccggtgg
tacctcaccct 1740	ttaccgagtc	ggcgacacag	tgtgggtccg	ccgacaccag	actaagaacc
tagaacctcg 1800	ctggaaagga	ccttacacag	tcctgctgac	caccccccacc	gccctcaaag
tagacggcat 1860	cgcagcttgg	atacacgccc	cccacgtgaa	ggctgccgac	cccggggtg
gaccatcctc 1920	tagactgcca	acatgggcac	cagcctgctg	tgctggatgg	ccctgtgcct
gctggcgcc 1980	gaccacgccc	atgcctgccc	ctacagcaac	cccagcctgt	gcagcggagg
cggcgccagc 2040	gagctgccc	cccagggcac	cttctccaac	gtgtccacca	acgtgagccc
agccaagccc 2100	accaccaccc	cctgtcctta	ttccaatcct	tccctgtgt	gcggaggggg
aggcagccca 2160	gcccccagac	ctccccacccc	agccccacc	atcgccagcc	agcctctgag
cctgagaccc 2220	gaggcctgcc	gcccagccgc	cggcggcgcc	gtgcacacca	gaggcctgga
tttcgcctgc 2280	gatatctaca	tctggggccc	actggccggc	acctgtggcg	tgctgctgct
gagcctggtg 2340	atcaccctgt	actgcaacca	ccgcaaccgc	aggcgcgtgt	gcaagtgc
caggcccggt 2400	gtgagagccg	agggcagagg	cagcctgctg	acctgcggcg	acgtggagga
gaacccaggc	cccatggaga	ccgacaccct	gctgctgtgg	gtgctgctgc	tgtgggtgcc

2460

aggcagcacc 2520	ggccaggtgc	agctgcagga	gtctggccca	ggcctggta	agcccagcca
gaccctgagc 2580	atcacctgca	ccgtgagcgg	cttcagcctg	gccagctaca	acatccactg
ggtgccggcag 2640	cccccaggca	agggcctgga	gtggctggc	gtgatctggg	ctggccggcag
caccaactac 2700	aacagcggcc	tgatgagccg	gctgaccatc	agcaaggaca	acagcaagaa
ccaggtttc 2760	ctgaagatga	gcagcctgac	agccgccccac	accggcgtgt	actactgcgc
caagcggagc 2820	gacgactaca	gctggttcgc	ctactgggc	cagggcaccc	tggtgaccgt
gagctctggc 2880	ggaggcggct	ctggcggagg	cggctctggc	ggaggcggca	gcgagaacca
gatgaccagg 2940	agccccagca	gcttgagcgc	cagcgtggc	gaccgggtga	ccatgacactg
cagagccagc 3000	agcagcgtga	gcagcagcta	cctgcactgg	taccagcaga	agagcggcaa
ggccccaag 3060	gtgtggatct	acagcaccag	caacctggcc	agcggcgtgc	ccagccggtt
cagccggcagc 3120	ggcagcggca	ccgactacac	cctgaccatc	agcagcctgc	agcccgagga
cttcgccacc 3180	tactactgcc	agcagtacag	cggctacccc	atcaccttcg	gccagggcac
caaggtggag 3240	atcaagcggt	cggatcccgc	cgagccaaa	tctcctgaca	aaactcacac
atgcccaccc 3300	tgcccagcac	ctcccggtgc	cggcccgta	gtttccctct	tccccccaaa
acccaaggac 3360	accctcatga	tcgcccggac	ccctgaggtc	acatgcgtgg	tggtgacgt
gagccacgaa 3420	gaccctgagg	tcaagttcaa	ctggtacgtg	gacggcgtgg	aggtgcataa
tgccaagaca 3480	aagccgcggg	aggagcagta	caacagcacg	taccgtgtgg	tcagcgtcct
caccgtcctg 3540	caccaggact	ggctgaatgg	caaggagta	aagtgcagg	tctccaacaa
agccctccca 3600	gccccatcg	agaaaaccat	ctccaaagcc	aaagggcagc	cccgagaacc
acaggtgtac	accctgcccc	catccggga	tgagctgacc	aagaaccagg	tcagcctgac

3660

ctgcctggc 3720	aaaggcttct	atcccagcga	catgcgcgtg	gagtgggaga	gcaatggca
accggagaac 3780	aactacaaga	ccacgcctcc	cgtgctggac	tccgacggct	ccttcttcct
ctacagcaag 3840	ctcaccgtgg	acaagagcag	gtggcagcag	ggaaacgtct	tctcatgctc
cgtatgcat 3900	gagggcctgc	acaatcacta	tacccagaaa	tctctgagtc	tgagccagg
caagaaggac 3960	cccaagttct	gggtcctggt	ggtggtggga	ggcgtgctgg	cctgttactc
tctcctggtg 4020	accgtggcct	tcatcatctt	ctgggtgcgc	tccaagagga	gcaggctcct
gcacagtgac 4080	tacatgaaca	tgactccccg	ccgccccggg	cccacccgca	agcattacca
gccctatgcc 4140	ccaccacgca	acttcgcagc	ctatcgctcc	cgggtgaagt	tctctcgctc
tgccgatgcc 4200	ccagcctatc	agcagggcca	gaatcagctg	tacaatgaac	tgaacctggg
caggcgggag 4260	gagtagcagc	tgctggataa	gcggagaggc	agagaccccg	agatggcgg
caaaccacgg 4320	cgcaaaaatc	cccaggaggg	actctataac	gagctgcaga	aggacaaaat
ggccgaggcc 4380	tattccgaga	tcggcatgaa	gggagagaga	agacgcggaa	agggccacga
cggcctgtat 4440	cagggattgt	ccaccgctac	aaaagataca	tatgatgcc	tgcacatgca
ggccctgcca 4500	cccagatgac	gcgtatcgat	actgttctca	tcacatcata	tcaaggttat
ataccatcaa 4560	tattgccaca	gatgttactt	agccttttaa	tatttctcta	atttagtgt
tatgcaatga 4620	tagttctctg	atttctgaga	ttgagtttct	catgtgtaat	gattatttag
agtttctctt 4680	tcatctgttc	aaatttttgt	ctagtttat	ttttactga	tttgtaaagac
ttctttttat 4740	aatctgcata	ttacaattct	ctttactggg	gtgttgcaaa	tatttctgt
cattctatgg 4800	cctgactttt	cttaatggtt	tttaatttt	aaaaataagt	cttaatattc
atgcaatcta	attaacaatc	ttttcttgcgt	ggtaggact	ttgagtctata	agaaatttt

4860

ctctacactg 4920	aagtcatgat	ggcatgcttc	tatattattt	tctaaaagat	ttaaagttt
gccttctcca 4980	tttagactta	taattcactg	gaatttttt	gtgtgtatgg	tatgacatat
gggttccctt 5040	ttatTTTTA	catataaata	tatTTCCCTG	tttttctaaa	aaagaaaaag
atcatcattt 5100	tcccattgt	aaatgccata	ttttttcat	aggtcactta	catatatcaa
tgggtctgtt 5160	tctgagctct	actctatTTT	atcagcctca	ctgtctatcc	ccacacatct
catgctttgc 5220	tctaaatctt	gatatTTAGT	ggaacattct	ttcccatttt	gttctacaag
aatatTTTG 5280	ttattgtctt	tgggctttct	atatacattt	tgaatgagg	ttgacaagtt
cggattagtc 5340	caatttgtta	aagacaggat	atcagtggtc	caggctctag	ttttgactca
acaatatcac 5400	cagctgaagc	ctatagagta	cgagccatag	ataaaataaa	agatTTTATT
tagtctccag 5460	aaaaaggggg	gaatgaaaga	ccccacctgt	aggtttggca	agctagctta
agtaacgcca 5520	tttgcaagg	catggaaaaa	tacataactg	agaatagaga	agttcagatc
aaggtcagga 5580	acagatggaa	cagctgaata	tgggccaaac	aggatatctg	tggtaagcag
ttcctgcccc 5640	ggctcaggc	caagaacaga	tggAACAGCT	gaatatggc	caaacaggat
atctgtggta 5700	agcagttcct	gccccggctc	aggGCCAAGA	acagatggtc	cccagatgcg
gtccagccct 5760	cagcagttc	tagagaacca	tcagatgtt	ccagggtgcc	ccaaggacct
gaaatgaccc 5820	tgtgccttat	ttgaactaac	caatcagttc	gcttctcgct	tctgttcgcg
cgcttctgct 5880	ccccgagctc	aataaaagag	cccacaaccc	ctcaactcggg	gcGCCAGTCC
tccgattgac 5940	tgagtgcgcc	gggtacccgt	gtatccaata	aaccctttt	cagttgcatc
cgacttgg 6000	tctcgctgtt	ccttgggagg	gtctcccttg	agtgattgac	tacccgtcag
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	Ser
					130			135			140			

Gly	Gly	Gly	Ser	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  
 210 215 220 225

Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr  
 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 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

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 Ser Gly  
130 135 140

Gly Gly Gly Ser 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 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 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  
 305 310 315 320

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

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	480
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	560
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 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			

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			
<220>			
<223> CAR против GD2, huKM666-HCH2CH3pvaa-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 Ser Gly  
 130 135 140

Gly Gly Gly Ser 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 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 Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln  
 580 585 590

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 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 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 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 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			

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CAR против GD2, huKM666-STK-CD28XOZ

&lt;400&gt; 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	Ser	Gly
				130			135			140				

Gly	Gly	Gly	Ser	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	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	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 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> 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 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 Ser Gly

130

135

140

Gly Gly Gly Ser 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 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

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 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 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 Ser Gly  
 130 135 140

Gly Gly Gly Ser 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 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

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 Ser Gly  
 130 135 140

Gly Gly Gly Ser 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 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

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
--	-----	-----

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

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser 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  
 625 630 635 640  
  
 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  
 705 710 715 720  
  
 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  
 785 790 795 800

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 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 Ala Cys Pro Tyr Ser  
50 55 60

Asn Pro Ser Leu Cys Ser 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  
 130 135 140 145

Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Arg Ala Glu  
 145 150 155 160

Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly  
 165 170 175

Pro Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val  
 180 185 190

Pro Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu  
 195 200 205

Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe  
 210 215 220

Ser Leu Ala Ser Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys  
 225 230 235 240

Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr  
 245 250 255

Asn Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys  
 260 265 270

Asn Gln Val Phe Leu Lys Met Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala  
 275 280 285

Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr  
 290 295 300

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser  
 305 310 315 320

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Asn Gln Met Thr Gln  
 325 330 335

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Met Thr  
 340 345 350

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 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

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

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	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			

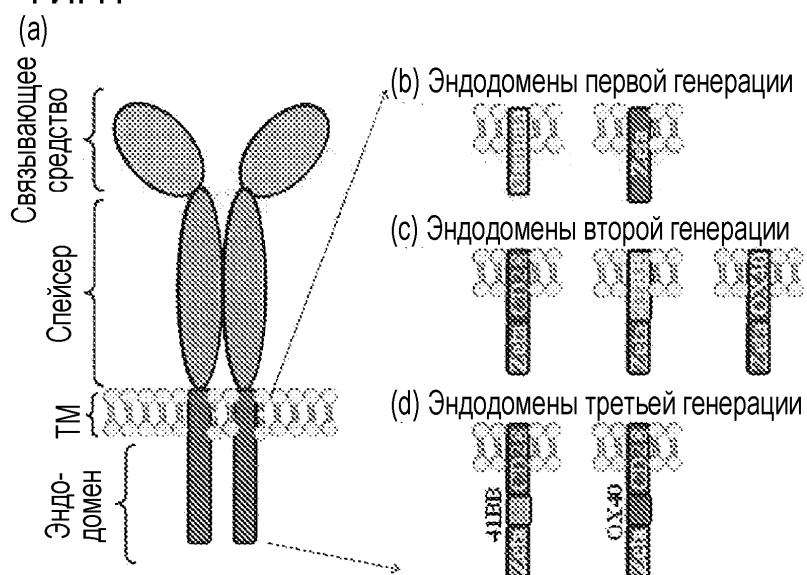
  

Asn	Arg	Arg	Arg	Val	Cys	Lys	Cys	Pro	Arg	Pro	Val	Val			
					145			150			155				

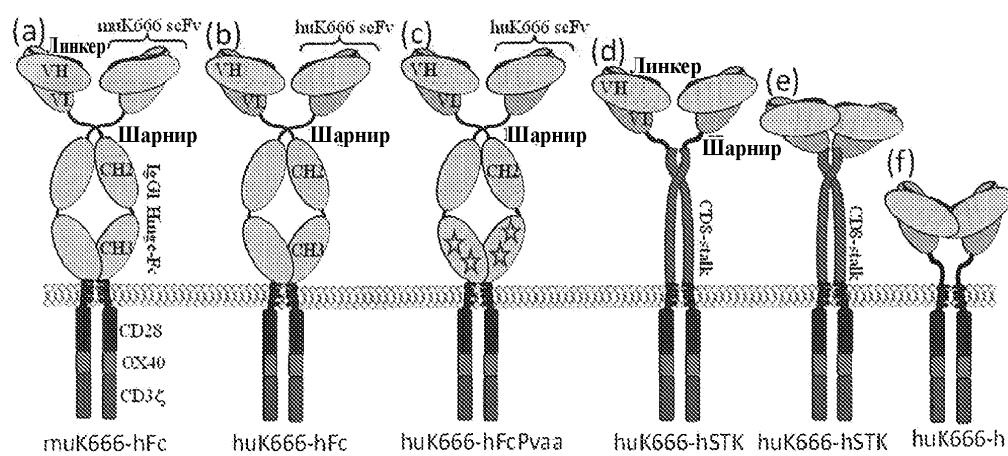
536682

1/18

ФИГ.1

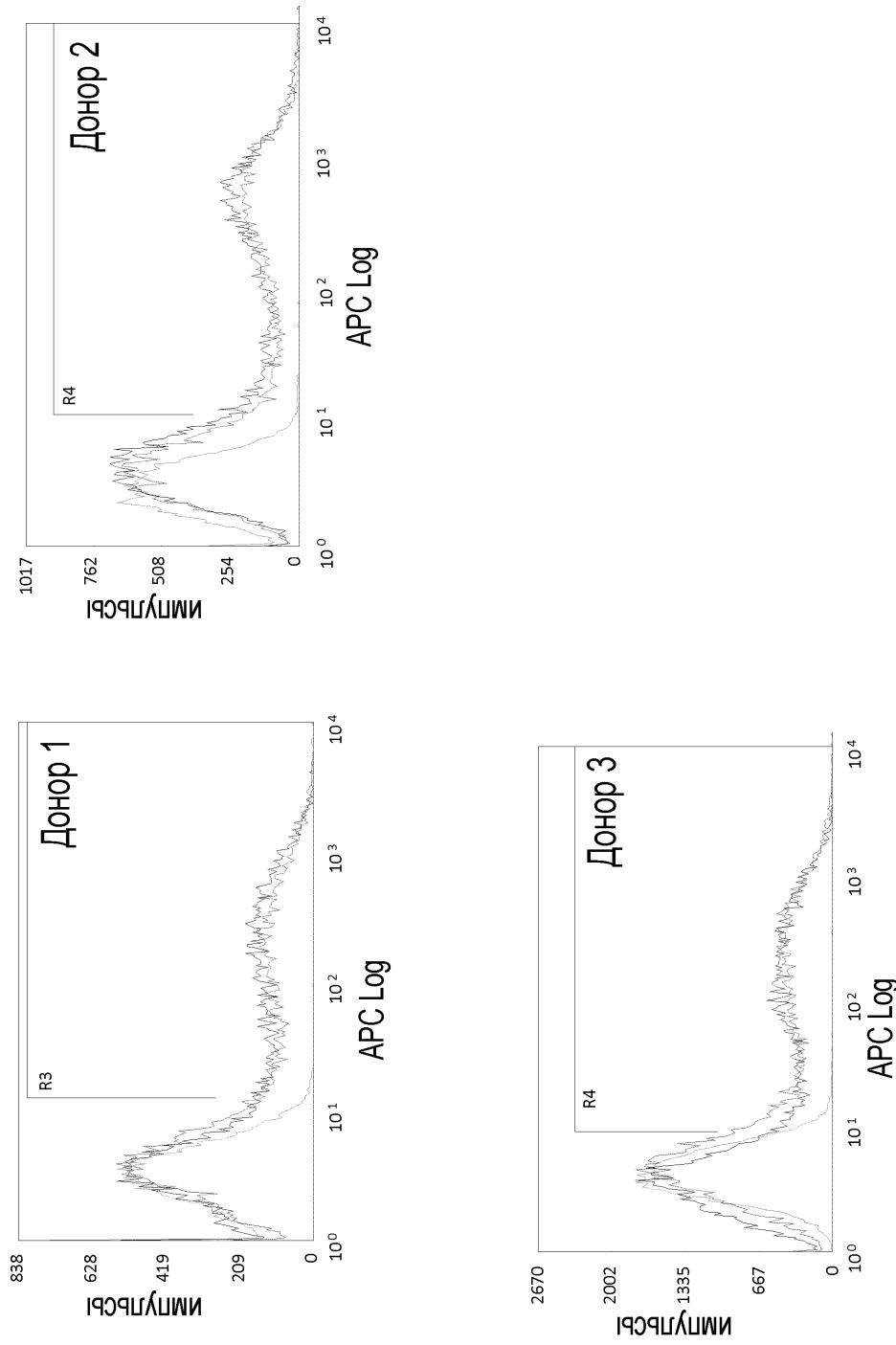


ФИГ.2

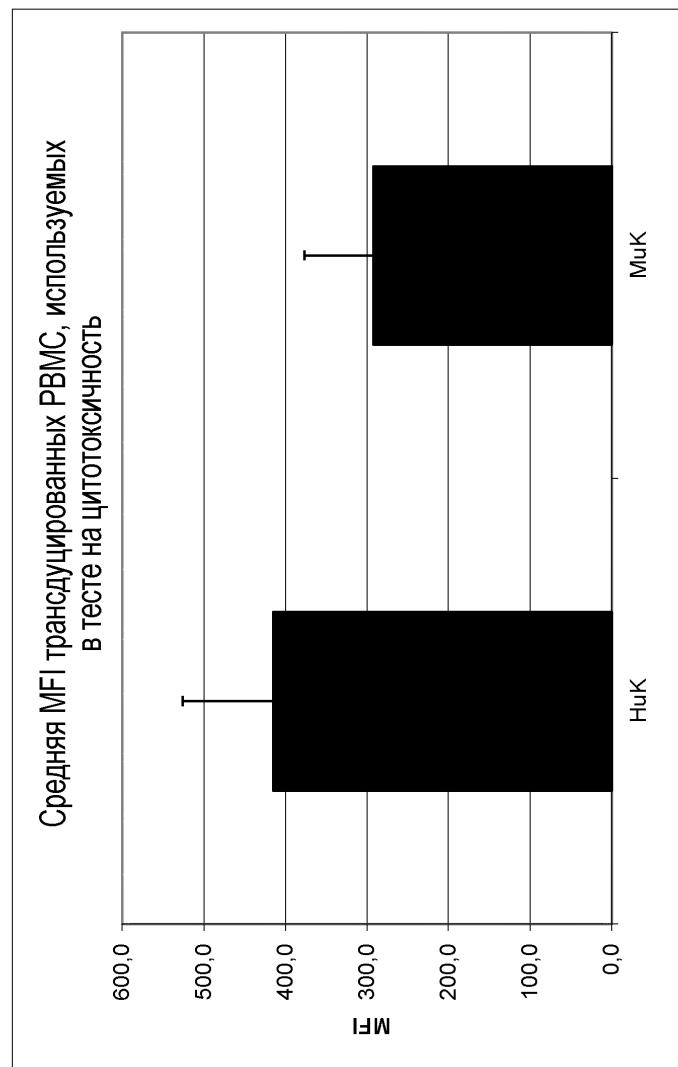


2/18

ФИГ. 3(а)



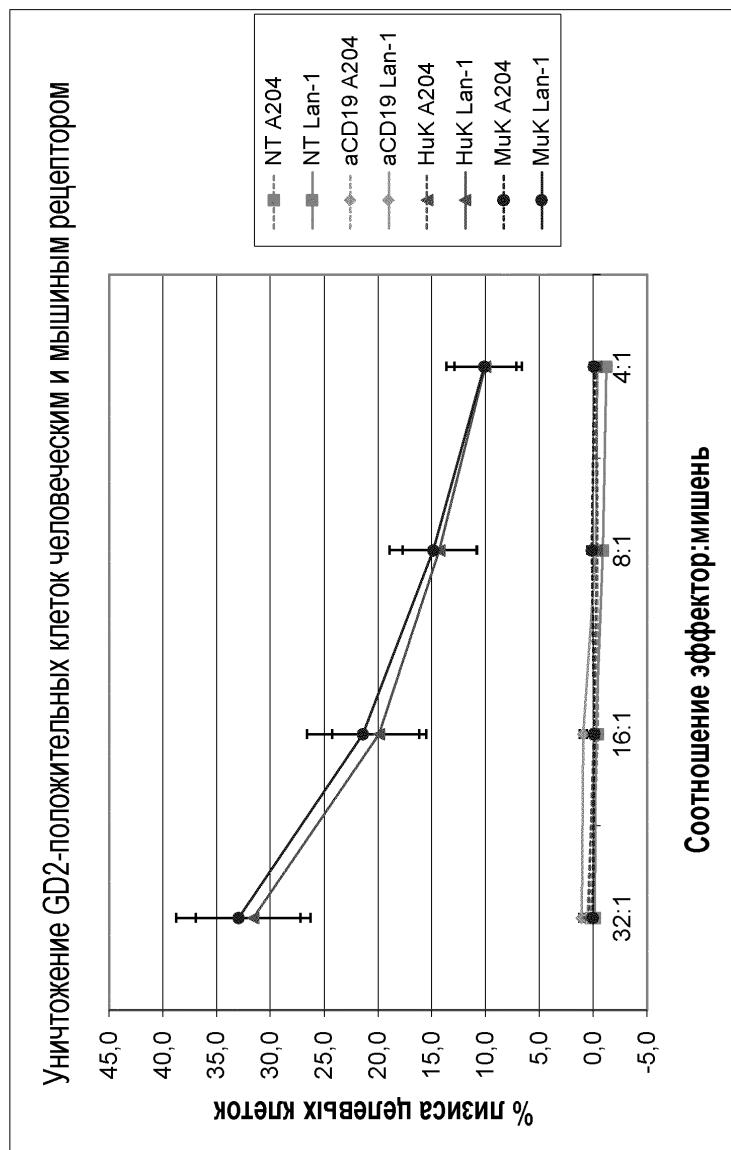
3/18



ФИГ.3(б)

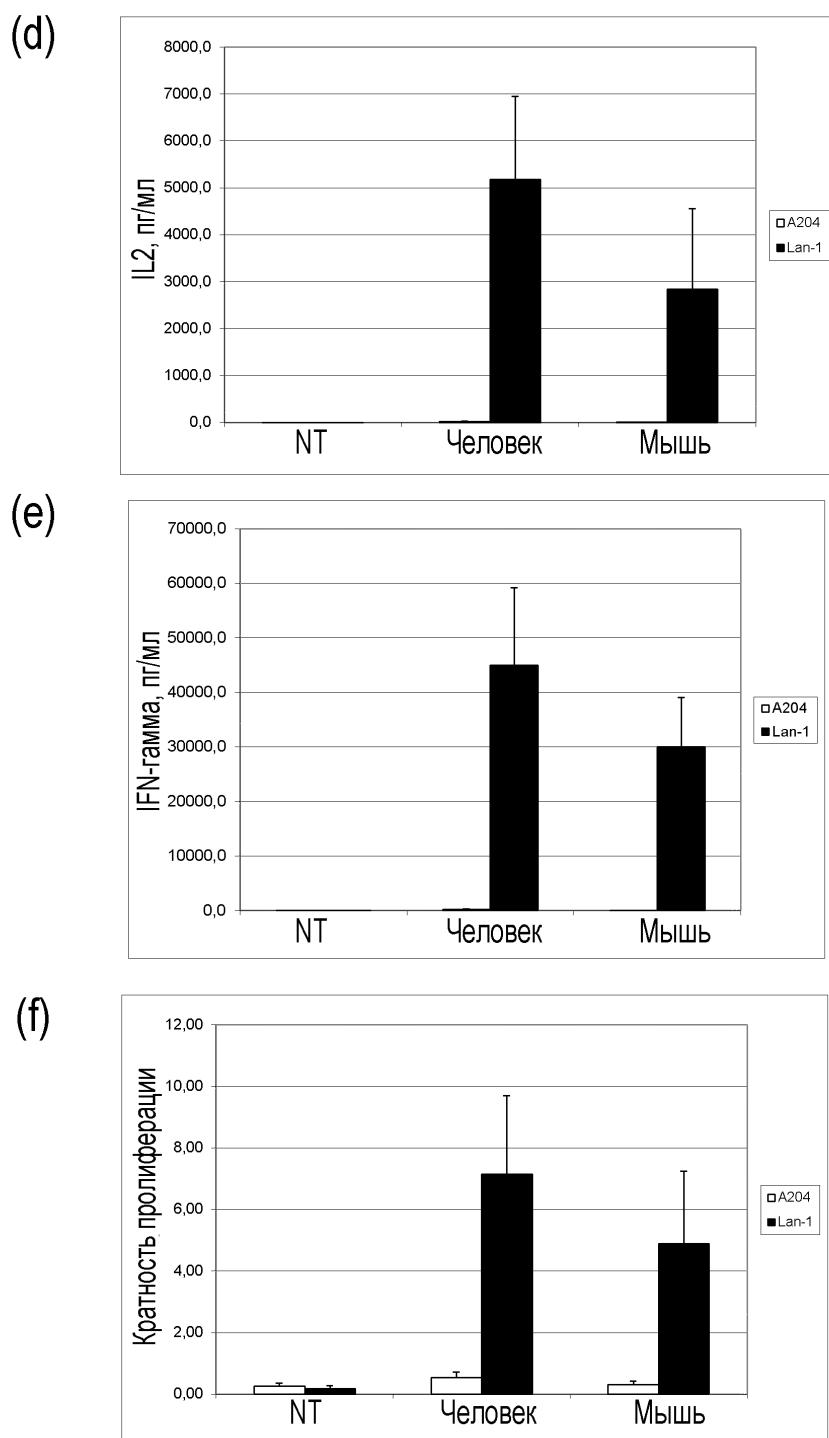
4/18

ФИГ.3(с)

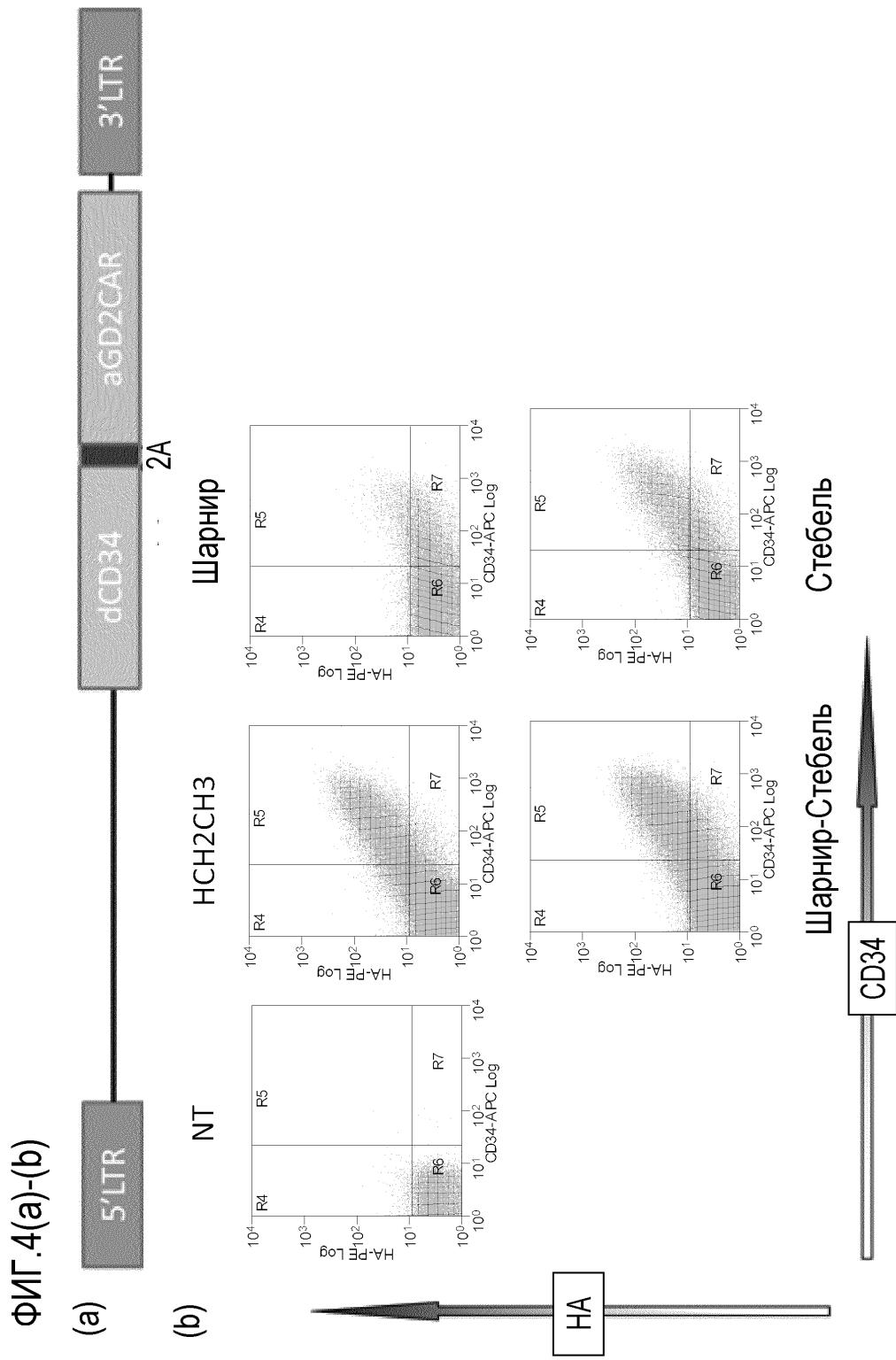


5/18

ФИГ.3(д)-(ф)

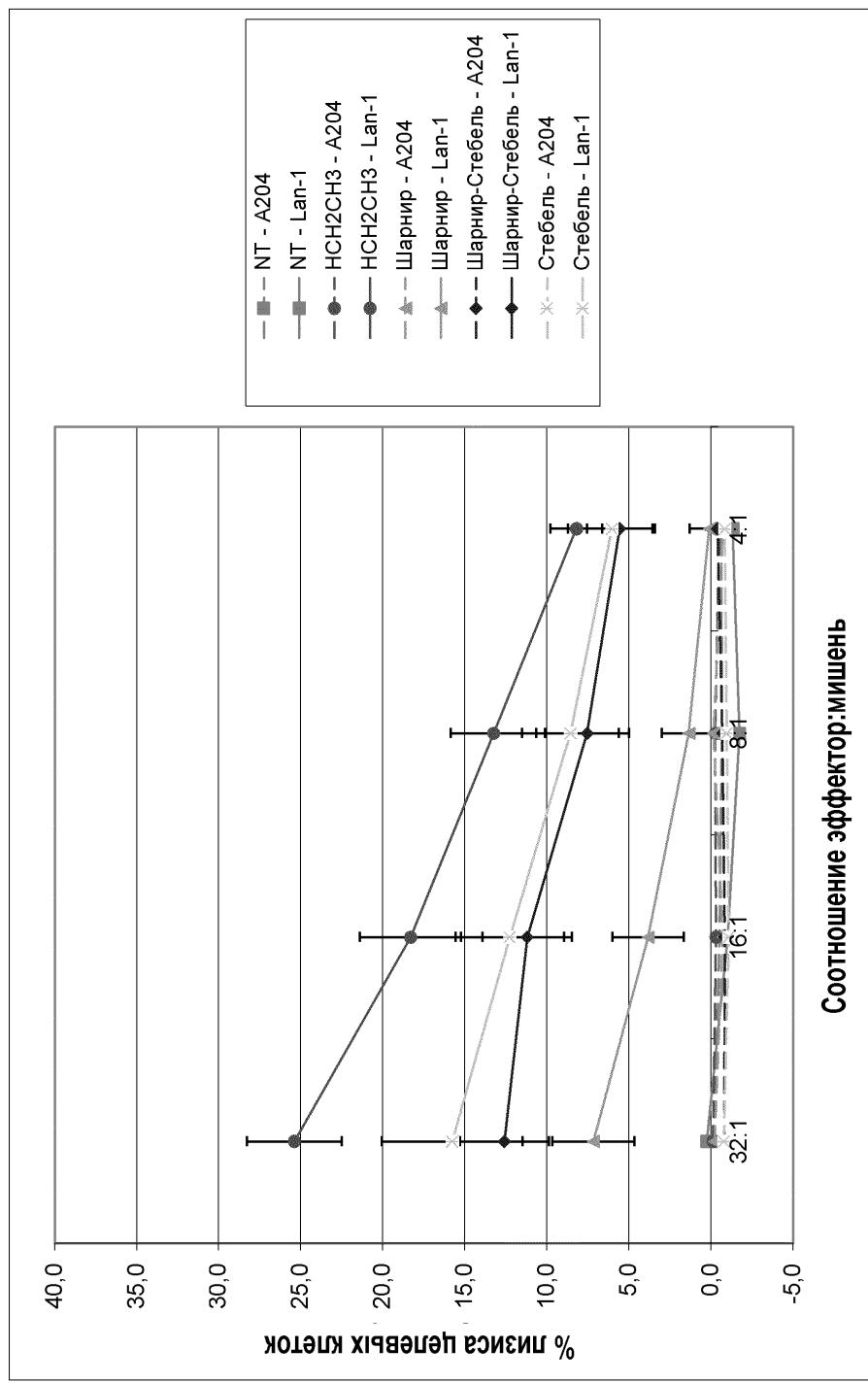


6/18



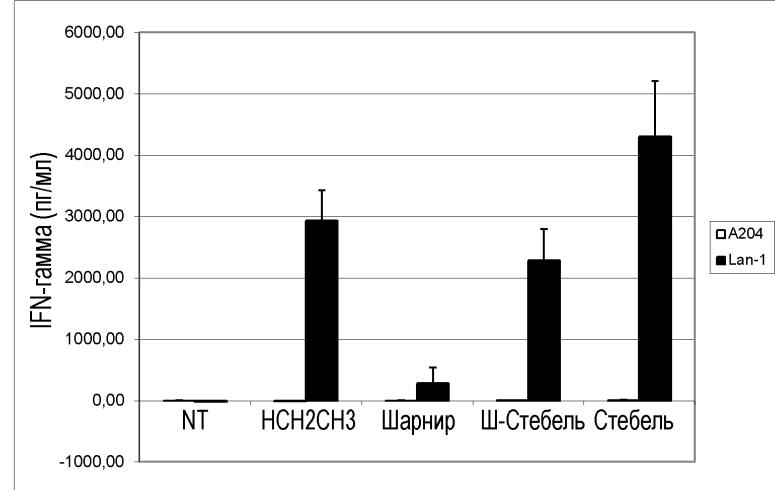
7/18

ФИГ.4(с)

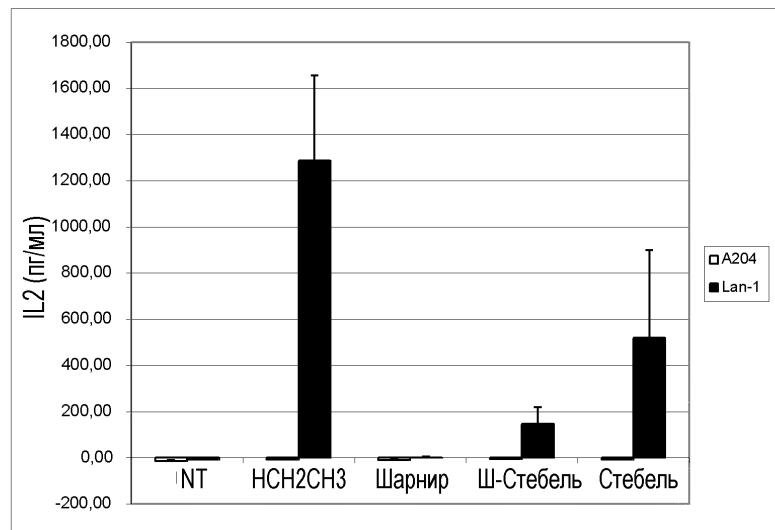


ФИГ.4(д)-(ф)  
(д)

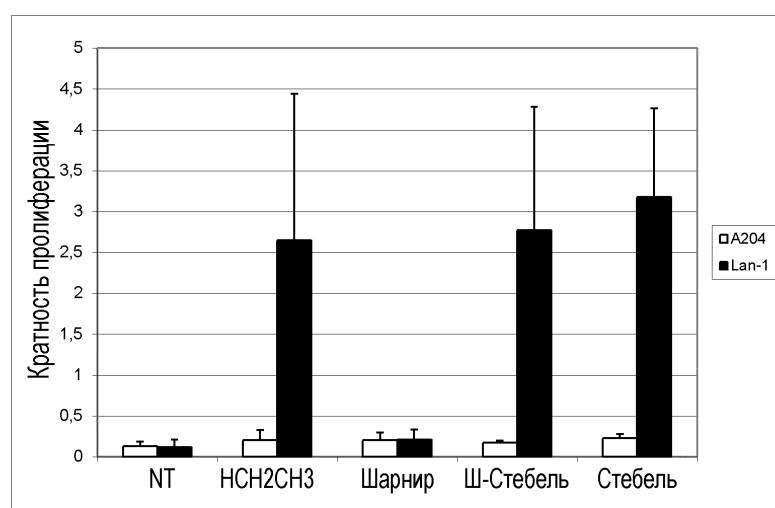
8/18



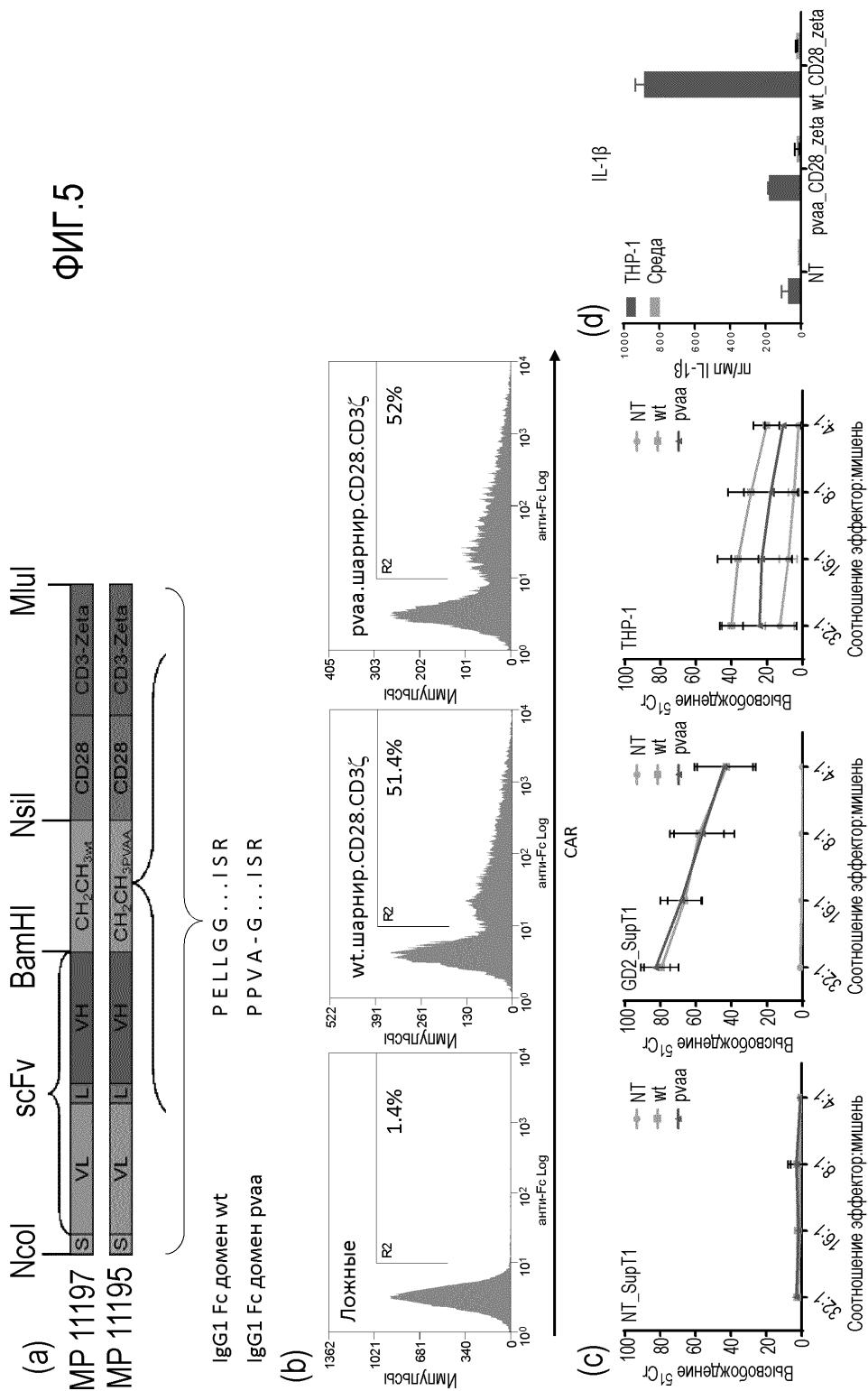
(е)



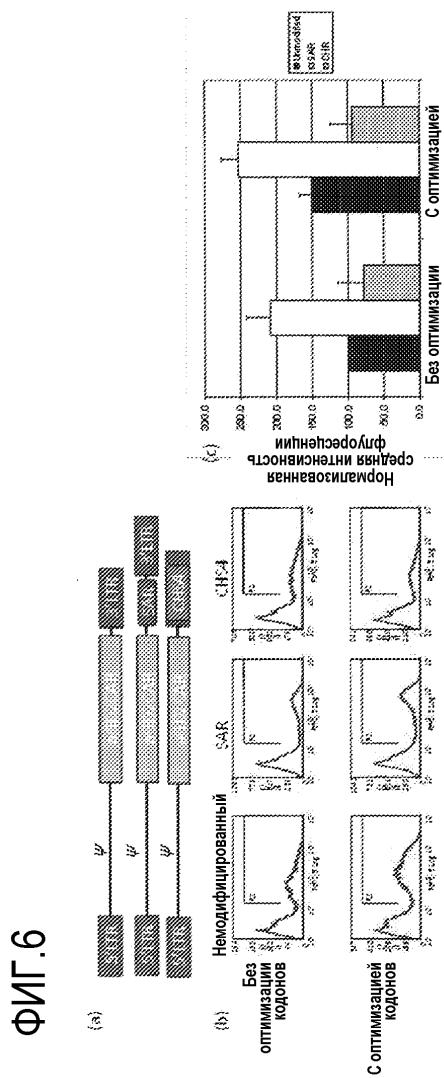
(ф)



9/18

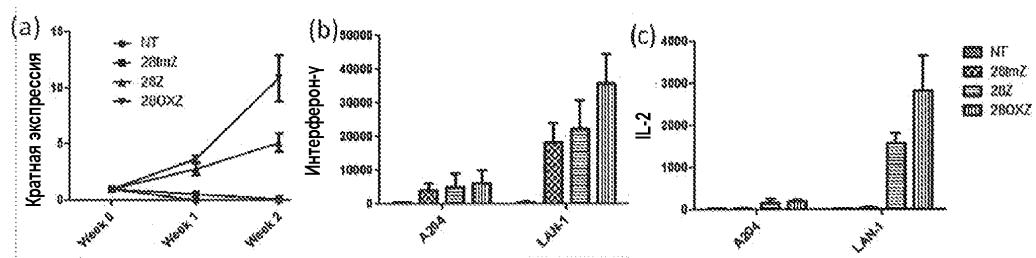


10/18

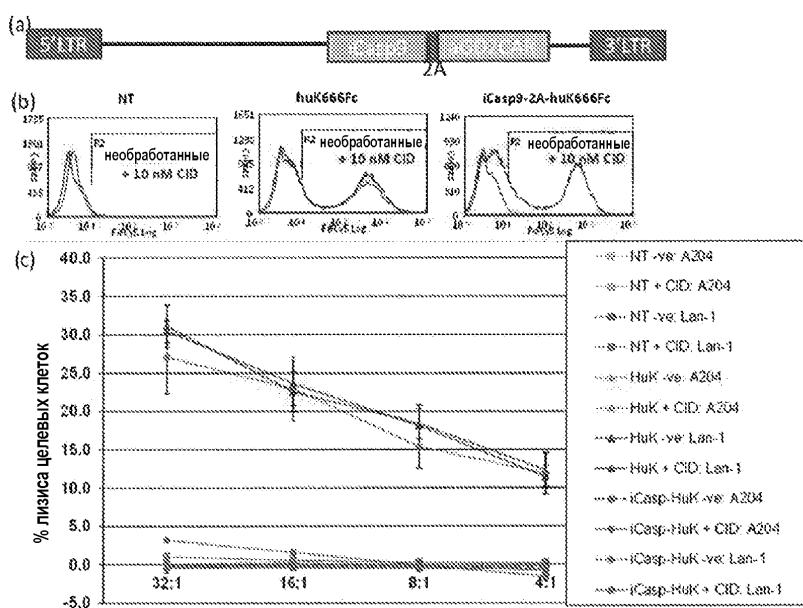


11/18

ФИГ.7

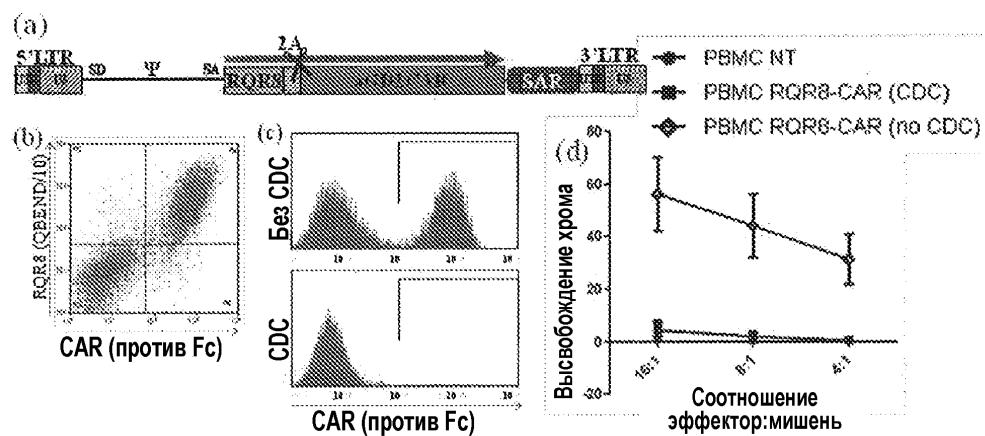


ФИГ.8

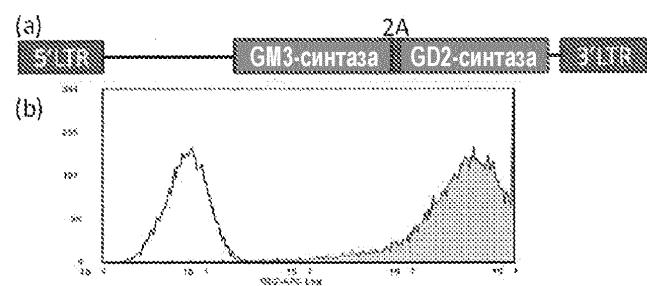


12/18

ФИГ.9

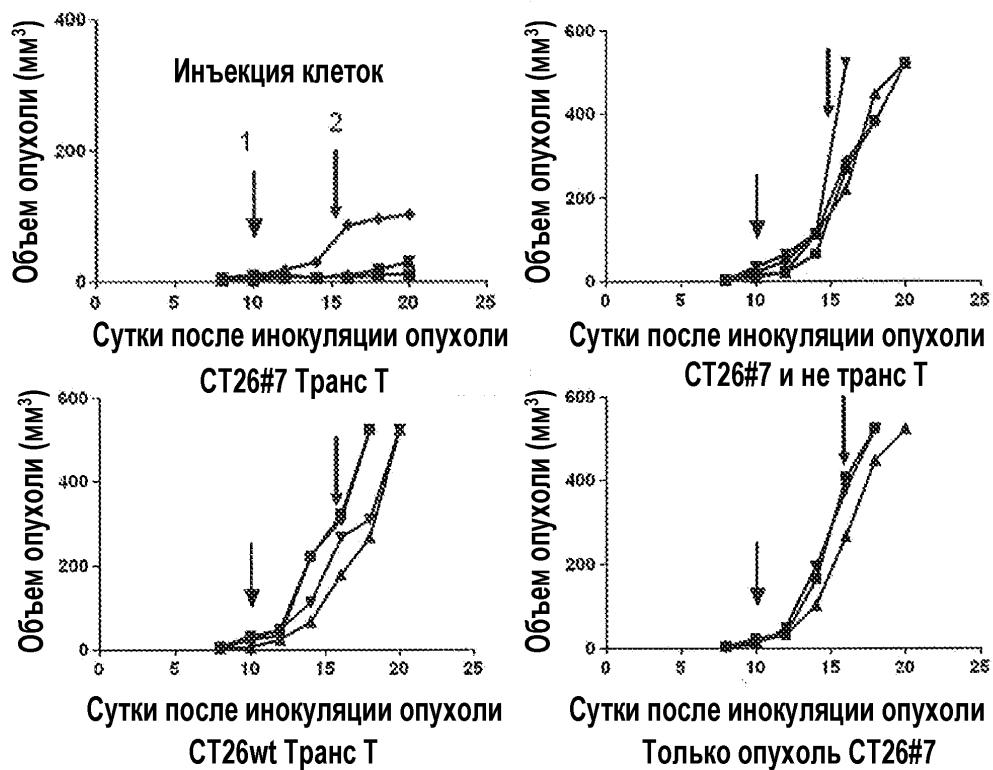


ФИГ.10



13/18

ФИГ.11



14/18

## ФИГ.12

**A.**

METDTILLWVLLWVPGSTGQVQVQKESGPVLYAPSOFLSITCTVSGFSLASYNIHWRQOPPGKLEWLGVIWAGGS  
 TNYNSALMSRLTISKDNISKNOVFLKMSLTAADTAVYYCAKRSDDYSWFAYWQGQTLVTVSSGGGGSGGGGGGG  
 SENQMTQSPSSLSASVGDRTMTICRAASSVSSSYLHWYQOKSGKAPKVVWVYISTSNLASGVPGFSGSGSGTDSYSL  
 ISSLOPEDFATYYCQOYSGYFITEFGAGTKVEVKRSDP

**FWVLVVVCGVLACYSLIVTVAFIIFWV**

**B.**

METDTILLWVLLWVPGSTGQVQVQKESGPVLYAPSOFLSITCTVSGFSLASYNIHWRQOPPGKLEWLGVIWAGGS  
 TNYNSALMSRLTISKDNISKNOVFLKMSLTAADTAVYYCAKRSDDYSWFAYWQGQTLVTVSSGGGGSGGGGGGG  
 SENQMTQSPSSLSASVGDRTMTICRAASSVSSSYLHWYQOKSGKAPKVVWVYISTSNLASGVPGFSGSGSGTDSYSL  
 ISSLOPEDFATYYCQOYSGYFITEFGAGTKVEVKRSDP

**FWVLVVVCGVLACYSLIVTVAFIIFWV**

**C.**

METDTILLWVLLWVPGSTGQVQVQKESGPVLYAPSOFLSITCTVSGFSLASYNIHWRQOPPGKLEWLGVIWAGGS  
 TNYNSALMSRLTISKDNISKNOVFLKMSLTAADTAVYYCAKRSDDYSWFAYWQGQTLVTVSSGGGGSGGGGGGG  
 SENQMTQSPSSLSASVGDRTMTICRAASSVSSSYLHWYQOKSGKAPKVVWVYISTSNLASGVPGFSGSGSGTDSYSL  
 ISSLOPEDFATYYCQOYSGYFITEFGAGTKVEVKRSDP

**FWVLVVVCGVLACYSLIVTVAFIIFWV**

**D.**

METDTILLWVLLWVPGSTGQVQVQKESGPVLYAPSOFLSITCTVSGFSLASYNIHWRQOPPGKLEWLGVIWAGGS  
 TNYNSALMSRLTISKDNISKNOVFLKMSLTAADTAVYYCAKRSDDYSWFAYWQGQTLVTVSSGGGGSGGGGGGG  
 SENQMTQSPSSLSASVGDRTMTICRAASSVSSSYLHWYQOKSGKAPKVVWVYISTSNLASGVPGFSGSGSGTDSYSL  
 ISSLOPEDFATYYCQOYSGYFITEFGAGTKVEVKRSDP

**FWVLVVVCGVLACYSLIVTVAFIIFWV**

**E.**

METDTILLWVLLWVPGSTGQVQVQKESGPVLYAPSOFLSITCTVSGFSLASYNIHWRQOPPGKLEWLGVIWAGGS  
 TNYNSALMSRLTISKDNISKNOVFLKMSLTAADTAVYYCAKRSDDYSWFAYWQGQTLVTVSSGGGGSGGGGGGG  
 SENQMTQSPSSLSASVGDRTMTICRAASSVSSSYLHWYQOKSGKAPKVVWVYISTSNLASGVPGFSGSGSGTDSYSL  
 ISSLOPEDFATYYCQOYSGYFITEFGAGTKVEVKRSDP

**FWVLVVVCGVLACYSLIVTVAFIIFWV**

15/18

## ФИГ.12 продолжение

5

6

PRDDDTLLWVLLVEGETGQVQLQESGPGLVKRSPQTLISITCTVSGF3LASYNIIHWRVQPPGEGLEWLGVIAWGGSTNYNSALMSRLTISKNSKNGVFLMNSLTAADTAVYVCAK3SDYSGNFAWGGCTLTVT3SGGGGSGGGGSGGGG3ENQMTQFQPSL3LAVSGVDRVTMTCRASSSVSSSSVYQOK5GKAPKUWYIYSTSMIASSVGPFR3SGGGSGSTDYTLT1SSLQGPEDFATTYCQOYSGVYITPCQCTKWRV1KRSDF

11

METDTTLEIWWVLLWVPGCTGQVQLQESGPGLVRPQSTQLSITCTVSGFJLASYNIRWVRQPPGKLEWLGVIAWGG  
TNYNSALMSRLTISKUNSKNQVFLERKSSLTAADTAVYCAKRSDDYSWNFAYWGQCTLTVT3SGGGGGGGGGGGGG  
SENQMTQFSSLSYASVQGRVIMTCRASSSVSSYYWYQOKSKCRAPKTWTYTSNLASGVPGRFSGGGSTDYTLT  
ISLQLRERFATPYCQOQSYGPYITFQKQTKTVEIKR **SDP**

1

1.  METDTILLENVILLENWEGS31QVQLQESGPGLVRP  
SQTLISITCTVSGFSLASYNIHNVRCPEGGKLEWLQVIAAGGSTNYNSALM3RUTISMNDNQVFLIMSS1TAALT  
AVYYCAKRRDDY3R6AYNGQGT1LTVSSSSGGGGGGGGGSEENQMTGSPSSLSRASVGDRVITMTCRASSSSVSSSY

1

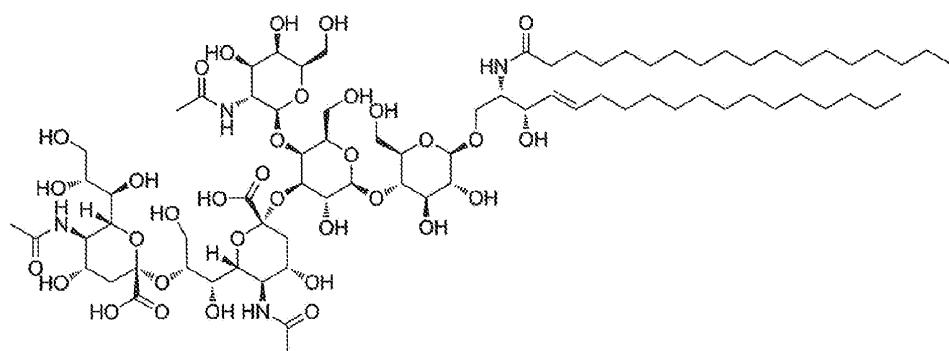
3. **YNTIRHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGSTNYNSALMSRLITTSKDNNSKNQVTLKMSSLTAAADTAVYYCAREGDDYSWPFAY**  
**WGQQTLYTV3SGG03GGCGSGGGSFENQNTQSPSSLASVGDRVTMTCRASESVSSSYLHWYQOKNSKAPKUWYI**  
**STEMNLASGVPSRF2GCGCSCHTDYLTIISLQFEDFATYYCQOYSGYPIFEQGQTKVETIKBSDE**

16/18

## ФИГ.12 продолжение

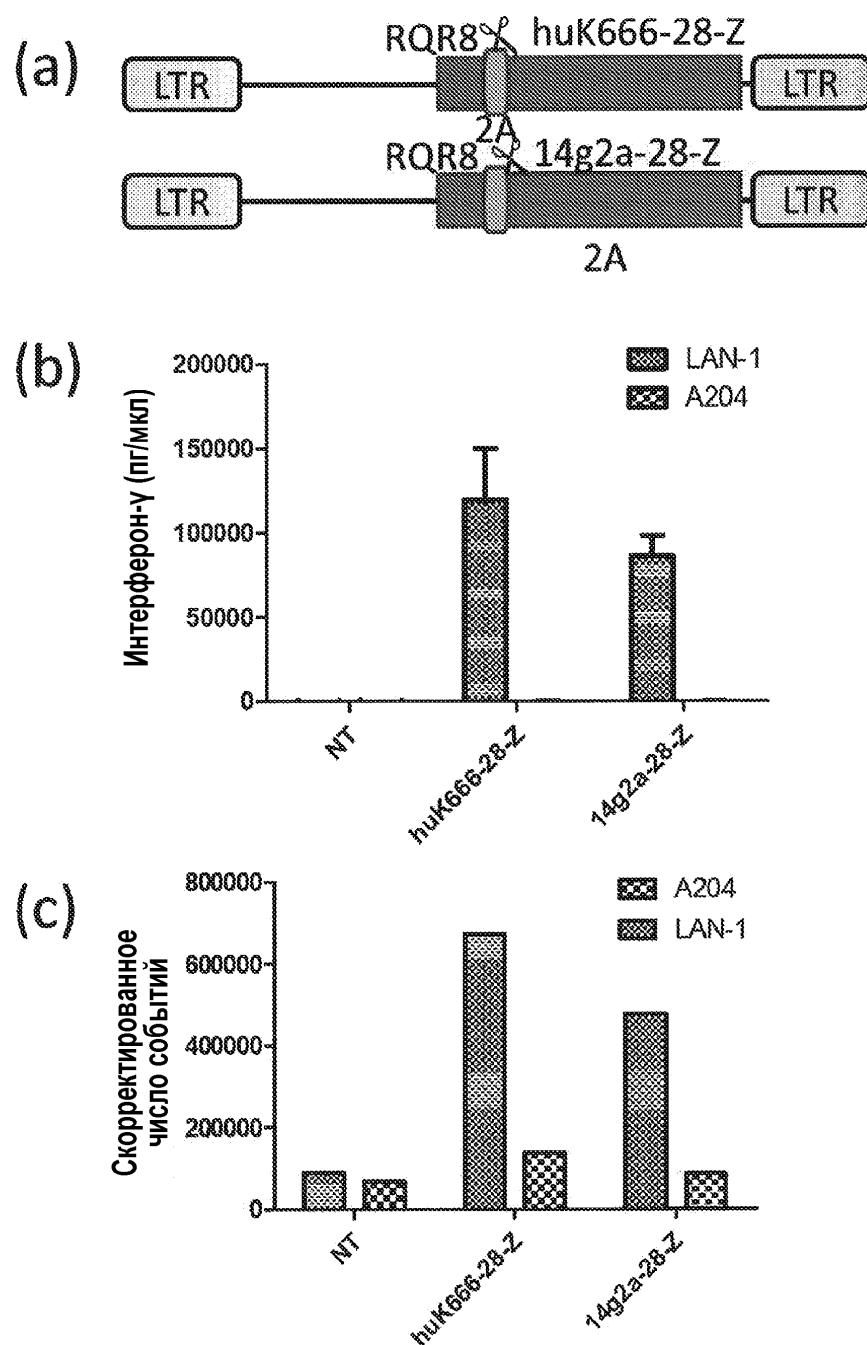
Область	Описание
Ген самоубийства	iCasp9 или RQR8
FMD-2A	Пептид 2A ящура
Сигнал	Сигнальный пептид
scFv1	scFv (muKM666 или huKM666)
SDP	Линкер и разрыв цепи
<b>Спейсер</b>	Стебель CD8 $\alpha$
<u>CD28 TM</u>	Трансмембранный домен CD28
CD28 эндо	Эндодомен CD28
OX40 эндо	Эндодомен OX40
CD3Z эндо	Эндодомен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

## ФИГ.13



17/18

ФИГ.14



18/18

ФИГ.15

