



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

C07K 14/725 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 14/7051 (2020.08); C07K 16/2851 (2020.08); A61K 35/17 (2020.08); A61P 35/00 (2020.08); A61P 37/02 (2020.08); C07K 2317/565 (2020.08); C07K 2319/02 (2020.08); C07K 2319/03 (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2017105161, 21.07.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.07.2015

Дата регистрации:
22.01.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
21.07.2014 CN PCT/CN2014/082602;
06.11.2014 CN PCT/CN2014/090500

(43) Дата публикации заявки: 21.08.2018 Бюл. № 24

(45) Опубликовано: 22.01.2021 Бюл. № 3

(85) Дата начала рассмотрения заявки PCT на
национальной фазе: 21.02.2017

(86) Заявка PCT:
US 2015/041337 (21.07.2015)

(87) Публикация заявки PCT:
WO 2016/014535 (28.01.2016)

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

БРОГДОН Дженнифер (US),
ЭБЕРСБАХ Хилмар (CH),
ДЖИЛЛ Саар (US),
ГЛАСС Дэвид (US),
ЯСКУР Джулия (CH),
КЕНДЕРИАН Саад (US),
МАННИК Джоан (US),
МАЙЛОН Майкл С. (US),
МЕРФИ Леон (US),
РИЧАРДСОН Селеста (US),
СИНГХ Решма (US),
ВЭЙ Лай (CN),
У Цилун (CN),
ЯН Цюмэй (CN),
ЧЖАН Цзицюань (CN)

(73) Патентообладатель(и):

НОВАРТИС АГ (CH),
ДЗЕ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ ЮНИВЕРСИТИ
ОФ ПЕНСИЛЬВАНИЯ (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2013/169625 A1, 14.11.2013.
ZHAO XIAOXIAN et al., "Targeting C-type
lectin-like molecule-1 for antibody-mediated
immunotherapy in acute myeloid leukemia."
Haematologica, 2010, 95(1): 71-78. KANAZAWA
NOBUO, "Dendritic cell immunoreceptors: C-
type lectin receptors for pattern-recognition and
signaling on antigen-presenting cells." Journal of
(см. прод.)

(54) ЛЕЧЕНИЕ РАКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХИМЕРНОГО АНТИГЕННОГО РЕЦЕПТОРА CLL-1

(57) Реферат:

Настоящая группа изобретений относится к иммунологии. Предложены CLL-1-связывающие домены и содержащие их полипептиды химерного антигенного рецептора (CAR), а также кодирующие молекулы нуклеиновой кислоты,

векторы, цитотоксическая клетка и клетка-киллер, содержащая их популяция иммунных эффекторных клеток. Кроме того, рассмотрены способы лечения млекопитающего и кондиционирования пациента перед

трансплантацией клеток, а также применение упомянутых изобретений для получения лекарственного средства и для лечения заболевания. Данная группа изобретений может

найти применение в терапии различных заболеваний, связанных с CLL-1. 15 н. и 42 з.п. ф-лы, 34 ил., 11 табл., 7 пр.

(56) (продолжение):

dermatological science, 2007, 45(2): 77-86. EA 201390847 A1, 30.12.2013.

R U 2 7 4 1 1 2 0 C 2

R U 2 7 4 1 1 2 0 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C07K 14/7051 (2020.08); *C07K 16/2851* (2020.08); *A61K 35/17* (2020.08); *A61P 35/00* (2020.08); *A61P 37/02* (2020.08); *C07K 2317/565* (2020.08); *C07K 2319/02* (2020.08); *C07K 2319/03* (2020.08)

(21)(22) Application: 2017105161, 21.07.2015

(24) Effective date for property rights:
21.07.2015

Registration date:
22.01.2021

Priority:

(30) Convention priority:
21.07.2014 CN PCT/CN2014/082602;
06.11.2014 CN PCT/CN2014/090500

(43) Application published: 21.08.2018 Bull. № 24

(45) Date of publication: 22.01.2021 Bull. № 3

(85) Commencement of national phase: 21.02.2017

(86) PCT application:
US 2015/041337 (21.07.2015)

(87) PCT publication:
WO 2016/014535 (28.01.2016)

Mail address:
129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

BROGDON, Jennifer (US),
EBERSBACH, Hilmar (CH),
GILL, Saar (US),
GLASS, David (US),
JASCUR, Julia (CH),
KENDERIAN, Saad (US),
MANNICK, Joan (US),
MILONE, Michael, C. (US),
MURPHY, Leon (US),
RICHARDSON, Celeste (US),
SINGH, Reshma (US),
WEI, Lai (CN),
WU, Qilong (CN),
YANG, Qiumei (CN),
ZHANG, Jiquan (CN)

(73) Proprietor(s):

NOVARTIS AG (CH),
THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (US)

(54) TREATING CANCER USING A CHIMERIC ANTIGENIC CLL-1 RECEPTOR

(57) Abstract:

FIELD: immunology.

SUBSTANCE: disclosed are CLL-1-binding domains and chimeric antigen receptor (CAR) polypeptide-containing polypeptides thereof, as well as nucleic acid coding molecules, vectors, a cytotoxic cell and a killer cell, containing a population of immune effector cells. In addition, methods of treating a

mammal and conditioning a patient before cell transplantation are disclosed, as well as use of said inventions for preparing a medicinal agent and for treating the disease.

EFFECT: this group of inventions can be used in therapy of various CLL-1 related diseases.

57 cl, 34 dwg, 11 tbl, 7 ex

Родственные заявки

Настоящая заявка притязает на приоритет РСТ заявки № РСТ/CN2014/082602, поданной 21 июля 2014, и РСТ заявки № РСТ/CN2014/090500, поданной 6 ноября 2014. Эти заявки полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Список последовательностей

Настоящая заявка содержит список последовательностей, который представлен в электронном виде в формате ASCII и таким образом полностью включен в настоящее описание. Копия указанного ASCII, созданная 15 июля 2015, называется N26077044WO3_SL.txt и имеет размер 339932 байта.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится вообще к применению иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток, NK-клеток), сконструированных для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR) для лечения заболеваний, связанных с экспрессией лектиноподобного С-типа рецептора 1 (CLL-1).

Предпосылки создания изобретения

Лектиноподобный С-типа рецептор 1 (CLL-1) также известен как MICL, CLEC12A, CLEC-1, лектин 1, ассоциированный с дендритными клетками, и DCAL-2. CLL-1 является гликопротеиновым рецептором и членом большого семейства лектиноподобных рецепторов С-типа, вовлеченных в иммунную регуляцию. CLL-1 экспрессируется на гемопоэтических клетках, главным образом, на клетках врожденного иммунитета, включая моноциты, DC, pDC и гранулоциты (Cancer Res., 2004; J. Immunol., 2009), и миелоидных клетках-предшественниках (Blood, 2007). CLL-1 также обнаружен на бластах острого миелоидного лейкоза (AML) и лейкозных стволовых клетках (например, CD34⁺/CD38⁻) (Zhao et al., Haematologica, 2010, 95(1): 71-78). Экспрессия CLL-1 также может соотноситься с другими миелоидными лейкозами, такими как острый миеломоноцитарный лейкоз, острый моноцитарный лейкоз, острый промиеломоноцитарный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз (CML) и миелодиспластический синдром (MDS).

Сущность изобретения

В первом аспекте изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR), причем CAR включает антитело или фрагмент антитела, который включает человеческий анти-CLL-1 связывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен (например, внутриклеточный сигнальный домен, включающий костимулирующий домен и/или первичный сигнальный домен). В одном воплощении CAR включает антитело или фрагмент антитела, который включает человеческий анти-CLL-1 связывающий домен, описанный в настоящем описании, трансмембранный домен, описанный в настоящем описании, и внутриклеточный сигнальный домен, описанный в настоящем описании, (например, внутриклеточный сигнальный домен, включающий костимулирующий домен и/или первичный сигнальный домен).

В воплощениях CAR включает человеческий анти-CLL-1 связывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, где указанный анти-CLL-1 связывающий домен включает определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (HC CDR1), определяющий комплементарность участок 2 тяжелой цепи (HC CDR2) и определяющий комплементарность участок 3 тяжелой цепи (HC CDR3) любой из аминокислотных последовательностей тяжелой цепи домена, связывающего CLL-1, перечисленных в таблице 2. В воплощениях человеческий CLL-1-связывающий домен также включает определяющий комплементарность участок 1 легкой цепи (LC

CDR1), определяющий комплементарность участок 2 легкой цепи (LC CDR2) и определяющий комплементарность участок 3 легкой цепи (LC CDR3). В воплощениях человеческий CLL-1-связывающий домен включает определяющий комплементарность участок 2 легкой цепи (LC CDR2) и определяющий комплементарность участок 3 легкой цепи (LC CDR3) любой из аминокислотных последовательностей легкой цепи домена, связывающего CLL-1, перечисленных в таблице 2.

В некоторых воплощениях CAR включает антитело или фрагмент антитела, который включает человеческий CLL-1-связывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, включающий костимулирующий домен и/или первичный сигнальный домен, и где указанный CLL-1-связывающий домен включает один или больше участков из определяющего комплементарность участка 1 легкой цепи (LC CDR1), определяющего комплементарность участка 2 легкой цепи (LC CDR2) и определяющего комплементарность участка 3 легкой цепи (LC CDR3) любой из аминокислотных последовательностей легкой цепи домена, связывающего CLL-1, перечисленных в таблице 2, и один или больше участков из определяющего комплементарность участка 1 тяжелой цепи (HC CDR1), определяющего комплементарность участка 2 тяжелой цепи (HC CDR2) и определяющего комплементарность участка 3 тяжелой цепи (HC CDR3) любой из аминокислотных последовательностей тяжелой цепи домена, связывающего CLL-1, перечисленных в таблице 2.

В одном воплощении кодированный человеческий анти-CLL-1 связывающий домен включает один или больше (например, все три) участков из определяющего комплементарность участка 1 легкой цепи (LC CDR1), определяющего комплементарность участка 2 легкой цепи (LC CDR2) и определяющего комплементарность участка 3 легкой цепи (LC CDR3) человеческого анти-CLL-1 связывающего домена, описанного в настоящем описании, и/или один или больше (например, все три) участков из определяющего комплементарность участка 1 тяжелой цепи (HC CDR1), определяющего комплементарность участка 2 тяжелой цепи (HC CDR2) и определяющего комплементарность участка 3 тяжелой цепи (HC CDR3) человеческого анти-CLL-1 связывающего домена, описанного в настоящем описании, например, человеческого анти-CLL-1 связывающего домена, включающего один или больше (например, все три) LC CDR и один или больше (например, все три) HC CDR.

В одном воплощении кодированный человеческий анти-CLL-1 связывающий домен включает переменный участок легкой цепи, описанный в настоящем описании (например, в таблице 2), и/или переменный участок тяжелой цепи, описанный в настоящем описании (например, в таблице 2). В одном воплощении кодированный человеческий анти-CLL-1 связывающий домен представляет собой scFv, включающий легкую цепь и тяжелую цепь аминокислотной последовательности из таблицы 2. В одном воплощении человеческий анти-CLL-1 связывающий домен (например, scFv) включает переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены, например, консервативные замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен, например, консервативных замен), аминокислотной последовательности переменного участка легкой цепи, представленной в таблице 2, или последовательности с 95-99% идентичностью с аминокислотной последовательностью из таблицы 2; и/или переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены, например, консервативные замены), но

не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен, например, консервативных замен), аминокислотной последовательности вариабельного участка тяжелой цепи, представленной в таблице 2, или последовательности с 95-99% идентичностью с аминокислотной последовательностью из таблицы 2.

5 В других воплощениях кодированный CLL-1-связывающий домен включает HC CDR1, HC CDR2 и HC CDR3 любой из аминокислотных последовательностей тяжелой цепи домена, связывающего CLL-1, перечисленных в таблице 2. В воплощениях CLL-1-связывающий домен включает LC CDR1, LC CDR2 и LC CDR3 любой из аминокислотных последовательностей легкой цепи домена, связывающего CLL-1, перечисленных в
10 таблице 2.

В некоторых воплощениях кодированный CLL-1-связывающий домен включает один, два или все LC CDR1, LC CDR2 и LC CDR3 любой из аминокислотных последовательностей легкой цепи домена, связывающего CLL-1, перечисленных в таблице 2, и один, два или все HC CDR1, HC CDR2 и HC CDR3 любой из аминокислотных
15 последовательностей тяжелой цепи домена, связывающего CLL-1, перечисленных в таблице 2.

В одном воплощении кодированный CLL-1-связывающий домен включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 39-51, 65-77, 195, 78-90 или 196. В воплощении кодированный CLL-1-связывающий
20 домен (например, scFv) включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены, например, консервативные замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен, например, консервативных замен), аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 39-51, 65-77, 195, 78-90 или 196, или последовательность с 95-99% идентичностью
25 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 39-51, 65-77, 195, 78-90 или 196. В другом воплощении кодированный CLL-1-связывающий домен включает вариабельный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 65-77 или 195, или последовательность с 95-99% идентичностью им. В другом воплощении кодированный CLL-1-связывающий домен
30 включает вариабельный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 66-74 или 196, или последовательность с 95-99% идентичностью им. В одном воплощении молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 52-64, или последовательность с 95-99% идентичностью
35 им.

В одном воплощении кодированный гуманизированный анти-CLL-1 связывающий домен включает линкер (Gly4-Ser)_n, где n равен 1, 2, 3, 4, 5 или 6, предпочтительно 3 или 4 (SEQ ID NO: 26). Вариабельный участок легкой цепи и вариабельный участок тяжелой цепи scFv может находиться, например, в любой из следующих ориентаций:
40 вариабельный участок легкой цепи - линкер - вариабельный участок тяжелой цепи или вариабельный участок тяжелой цепи - линкер - вариабельный участок легкой цепи.

В одном воплощении кодированный CAR включает трансмембранный домен, который включает трансмембранный домен белка, выбранного из группы, включающей альфа-, бета- или дзета-цепь Т-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4,
45 CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и CD154. В одном воплощении кодированный трансмембранный домен включает последовательность SEQ ID NO: 6. В одном воплощении кодированный трансмембранный домен включает аминокислотную последовательность, включающую

по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, или последовательность с 95-99% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6. В одном воплощении нуклеотидная последовательность, кодирующая трансмембранный домен, включает последовательность SEQ ID NO: 17 или последовательность с 95-99% идентичностью ей.

В одном воплощении кодированный анти-CLL-1 связывающий домен соединен с трансмембранным доменом шарнирным участком, например, шарнирным участком, описанным в настоящем описании. В одном воплощении кодированный шарнирный участок включает SEQ ID NO: 2 или последовательность с 95-99% идентичностью ей. В одном воплощении нуклеотидная последовательность, кодирующая шарнирный участок, включает последовательность SEQ ID NO: 13 или последовательность с 95-99% идентичностью ей.

В одном воплощении изолированная молекула нуклеиновой кислоты дополнительно включает последовательность, кодирующую костимулирующий домен, например, костимулирующий домен, описанный в настоящем описании. В воплощениях внутриклеточный сигнальный домен включает костимулирующий домен. В воплощениях внутриклеточный сигнальный домен включает первичный сигнальный домен. В воплощениях внутриклеточный сигнальный домен включает костимулирующий домен и первичный сигнальный домен.

В одном воплощении кодированный костимулирующий домен представляет собой функциональный сигнальный домен, полученный из белка, выбранного из группы, включающей молекулу ГКГС (МНС) класса I, белки рецепторы TNF, иммуноглобулиноподобные белки, цитокиновые рецепторы, интегрины, молекулы, передающие сигнал активации лимфоцитов (белки SLAM), рецепторы, активирующие NK-клетки, BTLA, лиганд Toll рецептора, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (тактильный), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a и лиганд, который специфически связывается с CD83. В воплощениях кодированный костимулирующий домен включает 4-1BB, CD27, CD28 или ICOS.

В одном воплощении кодированный костимулирующий домен 4-1BB включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. В одном воплощении кодированный костимулирующий домен включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7 или последовательность с 95-99% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7. В одном воплощении нуклеотидная последовательность, кодирующая костимулирующий домен, включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 18 или последовательность с 95-99% идентичностью ей. В другом воплощении кодированный костимулирующий домен CD28 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 482. В одном воплощении кодированный костимулирующий домен включает аминокислотную

последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 482, или последовательность с 95-99% идентичностью аминокислотной

последовательности SEQ ID NO: 482. В одном воплощении нуклеотидная

последовательность, кодирующая костимулирующий домен CD28, включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 483 или последовательность с 95-99%

идентичностью ей. В другом воплощении кодированный костимулирующий домен

CD27 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В одном

воплощении кодированный костимулирующий домен включает аминокислотную

последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций аминокислотной последовательности SEQ ID NO:

8, или последовательность с 95-99% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8. В одном воплощении нуклеотидная последовательность, кодирующая

костимулирующий домен CD27, включает нуклеотидную последовательность SEQ ID

NO: 19 или последовательность с 95-99% идентичностью ей.

В другом воплощении кодированный костимулирующий домен ICOS включает

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 484. В одном воплощении

кодированный костимулирующий домен включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5

модификаций аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 484, или

последовательность с 95-99% идентичностью аминокислотной последовательности

SEQ ID NO: 484. В одном воплощении нуклеотидная последовательность, кодирующая

костимулирующий домен ICOS, включает нуклеотидную последовательность SEQ ID

NO: 485 или последовательность с 95-99% идентичностью ей.

В воплощениях кодированный первичный сигнальный домен включает

функциональный сигнальный домен CD3-дзета. В воплощениях функциональный

сигнальный домен CD3-дзета включает последовательность SEQ ID NO: 9 (мутантный CD3-дзета) или SEQ ID NO: 10 (человеческий CD3-дзета дикого типа) или

последовательность с 95-99% идентичностью им.

В одном воплощении кодированный внутриклеточный сигнальный домен включает функциональный сигнальный домен 4-1BB и/или функциональный сигнальный домен

CD3-дзета. В одном воплощении кодированный внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 и/или

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10 CD3-дзета. В

одном воплощении внутриклеточный сигнальный домен включает аминокислотную

последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации, но

не более 20, 10 или 5 модификаций аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7 и/или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, или

последовательность с 95-99% идентичностью аминокислотной последовательности

SEQ ID NO: 7 и/или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO:

10. В одном воплощении кодированный внутриклеточный сигнальный домен включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 и аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, где последовательности,

включающие внутриклеточный сигнальный домен, экспрессируются в той же рамке,

что и отдельная пептидная цепь. В одном воплощении нуклеотидная последовательность,

кодирующая внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB, включает нуклеотидную

последовательность SEQ ID NO: 18 или последовательность с 95-99% идентичностью

ей, и/или SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21, или нуклеотидную последовательность

CD3-дзета с 95-99% идентичностью ей.

В одном воплощении кодированный внутриклеточный сигнальный домен включает функциональный сигнальный домен CD27 и/или функциональный сигнальный домен CD3-дзета. В одном воплощении кодированный внутриклеточный сигнальный домен CD27 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 и/или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10 CD3-дзета. В одном воплощении внутриклеточный сигнальный домен включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8 и/или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, или последовательность с 95-99% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8 и/или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10. В одном воплощении кодированный внутриклеточный сигнальный домен включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, где последовательности, включающие внутриклеточный сигнальный домен, экспрессируются в той же рамке, что и отдельная пептидная цепь. В одном воплощении нуклеотидная последовательность, кодирующая внутриклеточный сигнальный домен CD27, включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 19 или последовательность с 95-99% идентичностью ей, и/или нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21 CD3-дзета или последовательность с 95-99% идентичностью им.

В одном воплощении кодированный внутриклеточный сигнальный домен включает функциональный сигнальный домен CD28 и/или функциональный сигнальный домен CD3-дзета. В одном воплощении кодированный внутриклеточный сигнальный домен CD28 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 482 и/или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10 CD3-дзета. В одном воплощении внутриклеточный сигнальный домен включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 482 и/или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, или последовательность с 95-99% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 482 и/или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10. В одном воплощении кодированный внутриклеточный сигнальный домен включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 482 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, где последовательности, включающие внутриклеточный сигнальный домен, экспрессируются в той же рамке, что и отдельная пептидная цепь. В одном воплощении нуклеотидная последовательность, кодирующая внутриклеточный сигнальный домен CD28, включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 483 или последовательность с 95-99% идентичностью ей, и/или нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21 CD3-дзета или последовательность с 95-99% идентичностью им.

В одном воплощении кодированный внутриклеточный сигнальный домен включает функциональный сигнальный домен ICOS и/или функциональный сигнальный домен CD3-дзета. В одном воплощении кодированный внутриклеточный сигнальный домен ICOS включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 484 и/или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10 CD3-дзета. В одном воплощении внутриклеточный сигнальный домен включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации, но

не более 20, 10 или 5 модификаций аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 484 и/или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, или последовательность с 95-99% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 484 и/или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10. В одном воплощении кодированный внутриклеточный сигнальный домен включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 484 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, где последовательности, включающие внутриклеточный сигнальный домен, экспрессируются в той же рамке, что и отдельная пептидная цепь. В одном воплощении нуклеотидная последовательность, кодирующая внутриклеточный сигнальный домен ICOS, включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 485 или последовательность с 95-99% идентичностью ей, и/или нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21 CD3-дзета или последовательность с 95-99% идентичностью им.

В одном воплощении изолированная молекула CAR дополнительно включает лидерную последовательность, например, лидерную последовательность, описанную в настоящем описании. В одном воплощении лидерная последовательность включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или последовательность с 95-99% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

В другом аспекте изобретение относится к изолированной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей конструкцию CAR, включающую лидерную последовательность, например, лидерную последовательность, описанную в настоящем описании, например, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и анти-CLL-1 связывающий домен, описанный в настоящем описании, например, человеческий анти-CLL-1 связывающий домен, включающий LC CDR1, LC CDR2, LC CDR3, HC CDR1, HC CDR2 и HC CDR3, описанные в настоящем описании, человеческий анти-CLL-1 связывающий домен, описанный в таблице 2, или последовательность с 95-99% идентичностью ей, например, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, трансмембранный домен, описанный в настоящем описании, например, имеющий последовательность SEQ ID NO: 6, и внутриклеточный сигнальный домен, например, внутриклеточный сигнальный домен, описанный в настоящем описании. В одном воплощении кодированный внутриклеточный сигнальный домен включает костимулирующий домен, например, костимулирующий домен, описанный в настоящем описании (например, костимулирующий домен 4-1BB, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, костимулирующий домен CD28, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 482, или костимулирующий домен ICOS, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 484, или костимулирующий домен CD27, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8), и/или первичный сигнальный домен, например, первичный сигнальный домен, описанный в настоящем описании (например, CD3-дзета стимулирующий домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10).

В одном воплощении изолированная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая конструкцию CAR, включает последовательность человеческого анти-CLL-1 связывающего домена, кодированную нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63 и SEQ ID NO:64, или последовательностью с 95-99% идентичностью ей.

В одном воплощении изолированная молекула нуклеиновой кислоты включает (например, состоит из) нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную

последовательность CAR SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103 или SEQ ID NO: 197; или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две или три модификации (например, замены, например, консервативные замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103 или SEQ ID NO: 197; или аминокислотную последовательность, имеющую 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103 или SEQ ID NO: 197.

В одном воплощении изолированная молекула нуклеиновой кислоты включает (например, состоит из) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116 или SEQ ID NO: 198; или нуклеотидную последовательность, имеющую 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116 или SEQ ID NO: 198.

В одном аспекте изобретение относится к изолированной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей анти-CLL-1 связывающий домен, где анти-CLL-1 связывающий домен включает один или больше (например, все три) из определяющего комплементарность участка 1 легкой цепи (LC CDR1), определяющего комплементарность участка 2 легкой цепи (LC CDR2) и определяющего комплементарность участка 3 легкой цепи (LC CDR3) анти-CLL-1 связывающего домена, описанного в настоящем описании, и/или один или больше (например, все три) из определяющего комплементарность участка 1 тяжелой цепи (HC CDR1), определяющего комплементарность участка 2 тяжелой цепи (HC CDR2) и определяющего комплементарность участка 3 тяжелой цепи (HC CDR3) анти-CLL-1 связывающего домена, описанного в настоящем описании, например, человеческого анти-CLL-1 связывающего домена, включающего один или больше, например, все три, LC CDR и один или больше, например, все три, HC CDR.

В других воплощениях CLL-1-связывающий домен включает HC CDR1, HC CDR2 и HC CDR3 любой из аминокислотных последовательностей тяжелой цепи домена, связывающего CLL-1, перечисленных в таблице 2. В воплощениях CLL-1-связывающий домен дополнительно включает LC CDR1, LC CDR2 и LC CDR3. В воплощениях CLL-1 связывающий домен включает LC CDR1, LC CDR2 и LC CDR3 любой из аминокислотных последовательностей легкой цепи домена, связывающего CLL-1, перечисленных в таблице 2.

В некоторых воплощениях CLL-1-связывающий домен включает один, два или все LC CDR1, LC CDR2 и LC CDR3 любой из аминокислотных последовательностей легкой цепи домена, связывающего CLL-1, перечисленных в таблице 2, и один, два или все HC CDR1, HC CDR2 и HC CDR3 любой из аминокислотных последовательностей тяжелой цепи домена, связывающего CLL-1, перечисленных в таблице 2.

В одном воплощении кодированный анти-CLL-1 связывающий домен включает

5 вариабельный участок легкой цепи, описанный в настоящем описании (например, в SEQ ID NO: 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90 или 196), и/или вариабельный участок тяжелой цепи, описанный в настоящем описании (например, в SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77 или 195). В одном воплощении кодированный

10 анти-CLL-1 связывающий домен представляет собой scFv, включающий легкую цепь и тяжелую цепь аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 или 51. В одном воплощении анти-CLL-1 связывающий домен (например, scFv) включает вариабельный участок легкой цепи, включающий

15 аминокислотную последовательность, имеющую одну, две или три модификации (например, замены, например, консервативные замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций аминокислотной последовательности (например, замен, например, консервативных замен) аминокислотной последовательности вариабельного участка легкой цепи, представленного в SEQ ID NO: 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90 или 196, или последовательность с 95-99% идентичностью аминокислотной

20 последовательности SEQ ID NO: 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90 или 196; и/или вариабельный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, имеющую одну, две или три модификации (например, замены, например, консервативные замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций аминокислотной последовательности (например, замен, например, консервативных

25 замен) аминокислотной последовательности вариабельного участка тяжелой цепи, представленного в SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77 или 195, или последовательность с 95-99% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77 или 195. В одном воплощении анти-CLL-1 связывающий домен включает последовательность, выбранную из группы,

30 включающей SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 51, или последовательность с 95-99% идентичностью им. В одном воплощении кодированный анти-CLL-1 связывающий домен представляет собой scFv, и вариабельный участок легкой цепи, включающий

35 аминокислотную последовательность, описанную в настоящем описании, например, в таблице 2, соединяется с вариабельным участком тяжелой цепи, включающим аминокислотную последовательность, описанную в настоящем описании, например, в таблице 2, через линкер, например, линкер, описанный в настоящем описании. В одном воплощении кодированный анти-CLL-1 связывающий домен включает линкер (Gly₄-Ser)

40 n, где n равен 1, 2, 3, 4, 5 или 6, предпочтительно 4 (SEQ ID NO: 26). Вариабельный участок легкой цепи и вариабельный участок тяжелой цепи scFv могут находиться, например, в любой из следующих ориентаций: вариабельный участок легкой цепи - линкер - вариабельный участок тяжелой цепи или вариабельный участок тяжелой цепи - линкер - вариабельный участок легкой цепи. В одном воплощении изолированная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая человеческий анти-CLL-1 связывающий домен, включает последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO: 64, или последовательность с 95-99% идентичностью им.

45 В другом аспекте изобретение относится к изолированной молекуле CAR (например, полипептида), кодированной молекулой нуклеиновой кислоты. В одном воплощении изолированная молекула CAR включает последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO:

95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103 и SEQ ID NO: 197, или последовательность с 95-99% идентичностью им.

В другом аспекте изобретение относится к изолированной молекуле химерного антигенного рецептора (CAR) (например, полипептида), включающей анти-CLL-1-связывающий домен (например, человеческое антитело или фрагмент антитела, который специфически связывается с CLL-1), трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен (например, внутриклеточный сигнальный домен, включающий костимулирующий домен и/или первичный сигнальный домен). В одном воплощении CAR включает антитело или фрагмент антитела, который включает анти-CLL-1-связывающий домен (например, человеческое антитело или фрагмент антитела, который специфически связывается с CLL-1, описанные в настоящем описании), трансмембранный домен, описанный в настоящем описании, и внутриклеточный сигнальный домен, описанный в настоящем описании, например, внутриклеточный сигнальный домен, включающий костимулирующий домен и/или первичный сигнальный домен, описанный в настоящем описании.

В одном воплощении анти-CLL-1-связывающий домен включает один или больше (например, все три) из определяющего комплементарность участка 1 легкой цепи (LC CDR1), определяющего комплементарность участка 2 легкой цепи (LC CDR2) и определяющего комплементарность участка 3 легкой цепи (LC CDR3) анти-CLL-1-связывающего домена, описанного в настоящем описании, и/или один или больше (например, все три) из определяющего комплементарность участка 1 тяжелой цепи (HC CDR1), определяющего комплементарность участка 2 тяжелой цепи (HC CDR2) и определяющего комплементарность участка 3 тяжелой цепи (HC CDR3) анти-CLL-1-связывающего домена, описанного в настоящем описании, например, человеческого анти-CLL-1-связывающего домена, включающего один или больше (например, все три) LC CDR и один или больше (например, все три) HC CDR. В одном воплощении анти-CLL-1-связывающий домен включает переменный участок легкой цепи, описанный в настоящем описании (например, в таблице 2), и/или включает переменный участок тяжелой цепи, описанный в настоящем описании (например, в таблице 2). В одном воплощении анти-CLL-1-связывающий домен представляет собой scFv, включающий легкую цепь и тяжелую цепь аминокислотной последовательности, указанной в таблице 2. В одном воплощении анти-CLL-1-связывающий домен (например, scFv) включает переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены, например, консервативные замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен, например, консервативных замен) аминокислотной последовательности переменного участка легкой цепи, представленного в таблице 2, или последовательность с 95-99% идентичностью аминокислотной последовательности, представленной в таблице 2; и/или переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены, например, консервативные замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен, например, консервативных замен) аминокислотной последовательности переменного участка тяжелой цепи, представленного в таблице 2, или последовательность с 95-99% идентичностью аминокислотной последовательности, представленной в таблице 2.

В других воплощениях кодированный CLL-1-связывающий домен включает HC CDR1, HC CDR2 и HC CDR3 любой из аминокислотных последовательностей тяжелой

цепи CLL-1-связывающего домена, представленных в таблице 2. В воплощениях CLL-1-связывающий домен дополнительно включает LC CDR1, LC CDR2 и LC CDR3. В воплощениях CLL-1-связывающий домен включает LC CDR1, LC CDR2 и LC CDR3 любой из аминокислотных последовательностей легкой цепи CLL-1-связывающего домена, представленных в таблице 2.

В некоторых воплощениях кодированный CLL-1-связывающий домен включает один, два или все из LC CDR1, LC CDR2 и LC CDR3 любой из аминокислотных последовательностей легкой цепи CLL-1-связывающего домена, представленных в таблице 2, и один, два или все из HC CDR1, HC CDR2 и HC CDR3 любой из аминокислотных последовательностей тяжелой цепи CLL-1-связывающего домена, представленных в таблице 2.

В одном воплощении анти-CLL-1 связывающий домен включает последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 65-90 или SEQ ID NO: 195-196, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены, например, консервативные замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен, например, консервативных замен) любой из вышеуказанных последовательностей; или последовательность с 95-99% идентичностью им. В одном воплощении анти-CLL-1 связывающий домен представляет собой scFv, и вариабельный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, описанную в настоящем описании, например, в таблице 2, присоединяется к вариабельному участку тяжелой цепи, включающему аминокислотную последовательность, описанную в настоящем описании, например, в таблице 2, через линкер, например, линкер, описанный в настоящем описании. В одном воплощении анти-CLL-1 связывающий домен включает линкер (Gly₄-Ser)_n, где n равен 1, 2, 3, 4, 5 или 6, предпочтительно 4 (SEQ ID NO: 26). Вариабельный участок легкой цепи и вариабельный участок тяжелой цепи scFv могут находиться, например, в любой из следующих ориентаций: вариабельный участок легкой цепи - линкер - вариабельный участок тяжелой цепи или вариабельный участок тяжелой цепи - линкер - вариабельный участок легкой цепи.

В одном воплощении изолированная молекула CAR включает трансмембранный домен белка, выбранного из группы, включающей альфа-, бета- или дзета-цепь T-клеточного рецептора, CD28, CD3 эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и CD154. В одном воплощении трансмембранный домен включает последовательность SEQ ID NO: 6. В одном воплощении трансмембранный домен включает аминокислотную последовательность, включающую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены, например, консервативные замены), но не более 20, 10 или 5 модификаций (например, замен, например, консервативных замен), аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, или последовательность с 95-99% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6.

В одном воплощении анти-CLL-1 связывающий домен соединен с трансмембранным доменом шарнирным участком, например, шарнирным участком, описанным в настоящем описании. В одном воплощении кодированный шарнирный участок включает SEQ ID NO: 2 или последовательность с 95-99% идентичностью ей.

В воплощениях внутриклеточный сигнальный домен изолированной молекулы CAR включает костимулирующий домен. В воплощениях внутриклеточный сигнальный

домен изолированной молекулы CAR включает первичный сигнальный домен. В воплощениях внутриклеточный сигнальный домен изолированной молекулы CAR включает костимулирующий домен и первичный сигнальный домен. В одном воплощении изолированная молекулы CAR дополнительно включает

5 последовательность, кодирующую костимулирующий домен, например, костимулирующий домен, описанный в настоящем описании. В одном воплощении костимулирующий домен включает функциональный сигнальный домен белка, выбранного из группы, включающей молекулу ГКГС класса I, белки рецептора TNF, иммуноглобулиноподобные белки, цитокиновые рецепторы, интегрины, молекулы, передающие сигнал активации лимфоцитов (белки SLAM), рецепторы, активирующие NK клетки, BTLA, лиганд Толл рецептора, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (тактильный), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a и лиганд, который специфически связывается с CD83. В одном воплощении костимулирующий домен 4-1BB включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. В одном воплощении костимулирующий домен включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены, например, консервативные замены), но не более 20, 10 или 5 модификаций (например, замен, например, консервативных замен), аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, или последовательность с 95-99% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7. В другом воплощении костимулирующий домен CD28 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 482. В одном воплощении костимулирующий домен включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 482, или последовательность с 95-99% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 482. В другом воплощении костимулирующий домен CD27 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В одном воплощении костимулирующий домен включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, или последовательность с 95-99% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8. В другом воплощении костимулирующий домен ICOS включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 484. В одном воплощении костимулирующий домен включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 484, или последовательность с 95-99% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 484.

В воплощениях первичный сигнальный домен включает функциональный сигнальный домен CD3-дзета. В воплощениях функциональный сигнальный домен CD3-дзета включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 (мутантный CD3-дзета)

или SEQ ID NO: 10 (человеческий CD3-дзета дикого типа) или последовательность с 95-99% идентичностью им.

В одном воплощении внутриклеточный сигнальный домен включает функциональный сигнальный домен 4-1BB и/или функциональный сигнальный домен CD3-дзета. В одном воплощении внутриклеточный сигнальный домен включает последовательность SEQ ID NO: 7 и/или последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10. В одном воплощении внутриклеточный сигнальный домен включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены, например, консервативные замены), но не более 20, 10 или 5 модификаций (например, замен, например, консервативных замен) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7 и/или последовательности SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, или последовательность с 95-99% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7 и/или последовательности SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10. В одном воплощении внутриклеточный сигнальный домен включает последовательность SEQ ID NO: 7 и/или последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, где последовательности, включающие внутриклеточный сигнальный домен, экспрессируются в той же рамке, что и отдельная пептидная цепь.

В одном воплощении внутриклеточный сигнальный домен включает функциональный сигнальный домен CD27 и/или функциональный сигнальный домен CD3-дзета. В одном воплощении внутриклеточный сигнальный домен CD27 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 и/или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10 CD3-дзета. В одном воплощении внутриклеточный сигнальный домен включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8 и/или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, или последовательность с 95-99% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8 и/или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10. В одном воплощении внутриклеточный сигнальный домен включает последовательность SEQ ID NO: 8 и последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, где последовательности, включающие внутриклеточный сигнальный домен, экспрессируются в той же рамке, что и отдельная пептидная цепь.

В одном воплощении внутриклеточный сигнальный домен включает функциональный сигнальный домен CD28 и/или функциональный сигнальный домен CD3-дзета. В одном воплощении кодированный внутриклеточный сигнальный домен CD28 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 482 и/или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10 CD3-дзета. В одном воплощении внутриклеточный сигнальный домен включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 482 и/или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, или последовательность с 95-99% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 482 и/или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10. В одном воплощении внутриклеточный сигнальный домен включает последовательность SEQ ID NO: 482 и последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, где последовательности, включающие внутриклеточный сигнальный домен, экспрессируются в той же рамке, что и отдельная пептидная цепь.

В одном воплощении внутриклеточный сигнальный домен включает функциональный

сигнальный домен ICOS и/или функциональный сигнальный домен CD3-дзета. В одном воплощении кодированный внутриклеточный сигнальный домен ICOS включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 484 и/или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10 CD3-дзета. В одном воплощении
 5 внутриклеточный сигнальный домен включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 484 и/или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, или последовательность с 95-99% идентичностью аминокислотной последовательности
 10 SEQ ID NO: 484 и/или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10. В одном воплощении внутриклеточный сигнальный домен включает последовательность SEQ ID NO: 484 и последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, где последовательности, включающие внутриклеточный сигнальный домен, экспрессируются в той же рамке, что и отдельная пептидная цепь.

15 В одном воплощении изолированная молекула CAR дополнительно включает лидерную последовательность, например, лидерную последовательность, описанную в настоящем описании. В одном воплощении лидерная последовательность включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или последовательность с 95-99% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

20 В другом аспекте изобретение относится к изолированной молекуле CAR, включающей лидерную последовательность, например, лидерную последовательность, описанную в настоящем описании, например, лидерную последовательность SEQ ID NO: 1 или имеющую 95-99% идентичность ей, анти-CLL-1 связывающий домен, включающий LC CDR1, LC CDR2, LC CDR3, HC CDR1, HC CDR2 и HC CDR3, описанный
 25 выше, например, анти-CLL-1 связывающий домен, описанный в таблице 2, или последовательность с 95-99% идентичностью им, шарнирный участок, например, шарнирный участок, описанный в настоящем описании, например, шарнирный участок SEQ ID NO: 2 или имеющий 95-99% идентичность ему, трансмембранный домен, например, трансмембранный домен, описанный в настоящем описании, например,
 30 трансмембранный домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 6, или последовательность, имеющую 95-99% идентичность ей, внутриклеточный сигнальный домен, например, внутриклеточный сигнальный домен, описанный в настоящем описании (например, внутриклеточный сигнальный домен, включающий костимулирующий домен и/или первичный сигнальный домен). В одном воплощении
 35 внутриклеточный сигнальный домен включает костимулирующий домен, например, костимулирующий домен, описанный в настоящем описании, например, костимулирующий домен 4-1BB, имеющий последовательность SEQ ID NO: 7 или имеющую 95-99% идентичность ей, и/или первичный сигнальный домен, например, первичный сигнальный домен, описанный в настоящем описании, например,
 40 стимулирующий домен CD3-дзета, имеющий последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10 или имеющую 95-99% идентичность им. В одном воплощении внутриклеточный сигнальный домен включает костимулирующий домен, например, костимулирующий домен, описанный в настоящем описании, например, костимулирующий домен 4-1BB, имеющий последовательность SEQ ID NO: 7, и/или первичный сигнальный домен,
 45 например, первичный сигнальный домен, описанный в настоящем описании, например, стимулирующий домен CD3-дзета, имеющий последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10.

В одном воплощении изолированная молекула CAR включает (например, состоит

из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103 или SEQ ID NO: 197, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять, 10, 15, 20 или 30 модификаций (например, замен, например, консервативных замен), но не более 60, 50 или 40 модификаций (например, замен, например, консервативных замен) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103 или SEQ ID NO: 197, или аминокислотную последовательность, имеющую 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103 и SEQ ID NO: 197.

В одном аспекте изобретение относится к анти-CLL-1 связывающему домену, включающему один или больше участков (например, все три) из определяющего комплементарность участка 1 легкой цепи (LC CDR1), определяющего комплементарность участка 2 легкой цепи (LC CDR2) и определяющего комплементарность участка 3 легкой цепи (LC CDR3) анти-CLL-1 связывающего домена, описанного в настоящем описании, и/или один или больше участков (например, все три) из определяющего комплементарность участка 1 тяжелой цепи (HC CDR1), определяющего комплементарность участка 2 тяжелой цепи (HC CDR2) и определяющего комплементарность участка 3 тяжелой цепи (HC CDR3) анти-CLL-1 связывающего домена, описанного в настоящем описании, например, человеческого анти-CLL-1-связывающего домена, включающего один или больше (например, все три) LC CDR и один или больше, например, все три, HC CDR.

В других воплощениях кодированный CLL-1-связывающий домен включает HC CDR1, HC CDR2 и HC CDR3 любой из аминокислотных последовательностей тяжелой цепи CLL-1-связывающего домена, представленных в таблице 2. В воплощениях CLL-1-связывающий домен дополнительно включает LC CDR1, LC CDR2 и LC CDR3. В воплощениях CLL-1-связывающий домен включает LC CDR1, LC CDR2 и LC CDR3 любой из аминокислотных последовательностей легкой цепи CLL-1-связывающего домена, представленных в таблице 2.

В некоторых воплощениях кодированный CLL-1-связывающий домен включает один, два или все LC CDR1, LC CDR2 и LC CDR3 любой из аминокислотных последовательностей легкой цепи CLL-1-связывающего домена, представленных в таблице 2, и один, два или все из HC CDR1, HC CDR2 и HC CDR3 любой из аминокислотных последовательностей тяжелой цепи CLL-1-связывающего домена, представленных в таблице 2.

В одном воплощении анти-CLL-1 связывающий домен включает переменный участок легкой цепи, описанный в настоящем описании (например, в SEQ ID NO: 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90 или 196) и/или переменный участок тяжелой цепи, описанный в настоящем описании (например, в in SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77 или 195). В одном воплощении анти-CLL-1 связывающий домен представляет собой scFv, включающий легкую цепь и тяжелую цепь аминокислотной последовательности ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 или 51. В одном воплощении анти-CLL-1 связывающий домен (например, scFv) включает переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность,

имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены, например, консервативные замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен, например, консервативных замен) аминокислотной последовательности

5 варьибельного участка легкой цепи, представленного в SEQ ID NO: 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90 или 196, или последовательность с 95-99% идентичностью аминокислотной последовательности в SEQ ID NO: 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90 или 196; и/или варьибельный участок тяжелой цепи, включающий

10 аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены, например, консервативные замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен, например, консервативных замен) аминокислотной последовательности варьибельного участка тяжелой цепи,

представленного в SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77 или 195, или последовательность с 95-99% идентичностью аминокислотной последовательности в SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77 или 195. В одном воплощении

15 анти-CLL-1 связывающий домен включает последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 или SEQ ID NO: 51, или последовательность с 95-99% идентичностью им. В одном воплощении анти-CLL-1 связывающий домен представляет

20 собой scFv, и варьибельный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, описанную в настоящем описании, например, в таблице 2, присоединяется к варьибельному участку тяжелой цепи, включающему аминокислотную последовательность, описанную в настоящем описании, например, в таблице 2, через линкер, например, линкер, описанный в настоящем описании. В одном воплощении

25 анти-CLL-1 связывающий домен включает линкер (Gly₄-Ser)_n, где n равен 1, 2, 3, 4, 5 или 6, предпочтительно 4 (SEQ ID NO: 26). Варибельный участок легкой цепи и варьибельный участок тяжелой цепи scFv могут находиться, например, в любой из следующих ориентаций: варьибельный участок легкой цепи - линкер - варьибельный участок тяжелой цепи или варьибельный участок тяжелой цепи - линкер - варьибельный

30 участок легкой цепи.

В другом аспекте изобретение относится к вектору, включающему молекулу нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем описании, например, молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, описанный в настоящем описании. В одном воплощении вектор выбирают из группы, включающей ДНК, РНК, плазмиду,

35 лентивирусный вектор, аденовирусный вектор или ретровирусный вектор.

В одном воплощении вектор представляет собой лентивирусный вектор. В одном воплощении вектор дополнительно включает промотор. В одном воплощении промотор представляет собой промотор EF-1. В одном воплощении промотор EF-1 включает SEQ ID NO: 11. В другом воплощении промотор представляет собой промотор PGK,

40 например, усеченный промотор PGK, описанный в настоящем описании.

В одном воплощении вектор представляет собой транскрибированный *in vitro* вектор, например, вектор, который транскрибирует РНК молекулы нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем описании. В одном воплощении нуклеотидная

45 последовательность в векторе дополнительно включает хвост поли(А), например, хвост поли(А), описанный в настоящем описании, например, включающий примерно 150 аденозиновых оснований (SEQ ID NO: 312). В одном воплощении нуклеотидная последовательность в векторе дополнительно включает 3'UTR, например, 3'UTR, описанную в настоящем описании, например, включающую по меньшей мере один

повтор 3'UTR, происходящей от человеческого бета-глобулина. В одном воплощении нуклеотидная последовательность в векторе дополнительно включает промотор, например, промотор T2A.

В другом аспекте изобретение относится к клетке, включающей вектор, описанный в настоящем описании. В одном воплощении клетка представляет собой клетку, описанную в настоящем описании, например, иммунную эффекторную клетку, например, человеческую Т-клетку, описанную в настоящем описании, или человеческую НК-клетку, например, человеческую НК-клетку, описанную в настоящем описании. В одном воплощении человеческая Т-клетка представляет собой CD8+ Т-клетку.

В другом воплощении CAR-экспрессирующая клетка, описанная в настоящем описании, дополнительно экспрессирует другой агент, например, агент, который усиливает активность CAR-экспрессирующей клетки. Например, в одном воплощении агент может представлять собой агент, который ингибирует ингибирующую молекулу. Примеры ингибирующих молекул включают PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, молекула ГКГС класса I, ГКГС класса II, GAL9, аденозина и TGFR-бета. В одном воплощении агент, который ингибирует ингибирующую молекулу, включает первый полипептид, например, ингибирующую молекулу, ассоциированный со вторым полипептидом, который обеспечивает положительный сигнал для клетки, например, внутриклеточный сигнальный домен, описанный в настоящем описании. В одном воплощении агент включает первый полипептид, например, ингибирующую молекулу, такую как PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, молекула ГКГС класса I, ГКГС класса II, GAL9, аденозина и TGFR-бета, или фрагмент любой из них (например, по меньшей мере часть внеклеточного домена любой из них), и второй полипептид, который представляет собой внутриклеточный сигнальный домен, описанный в настоящем описании (например, включающий костимулирующий домен (например, 41BB, CD27 или CD28, например, как описано в настоящем описании) и/или первичный сигнальный домен (например, сигнальный домен CD3-дэета, описанный в настоящем описании)). В одном воплощении агент включает первый полипептид PD1 или его фрагмент (например, по меньшей мере часть внеклеточного домена PD1) и второй полипептид внутриклеточного сигнального домена, описанного в настоящем описании (например, сигнального домена CD28, описанного в настоящем описании, и/или сигнального домена CD3-дэета, описанного в настоящем описании).

В другом аспекте изобретение относится к способу получения клетки, включающему трансдукцию клетки, описанной в настоящем описании, например, иммунной эффекторной клетки, описанной в настоящем описании, например, Т-клетки или НК-клетки, описанной в настоящем описании, вектором, включающим нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, например, CAR, описанный в настоящем описании.

Настоящее изобретение также относится к способу получения популяции сконструированных методом РНК клеток, например, клеток, описанных в настоящем описании, например, Т-клеток или НК-клеток, временно экспрессирующих экзогенную РНК. Способ включает введение в клетку транскрибированной *in vitro* РНК или синтетической РНК, где РНК включает нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу CAR, описанную в настоящем описании.

В другом аспекте изобретение относится к способу предоставления

противоопухолевого иммунитета млекопитающему, включающему введение млекопитающему эффективного количества клеток, экспрессирующих молекулу CAR, например, клеток, экспрессирующих молекулу CAR, описанную в настоящем описании. В одном воплощении клетка представляет собой иммунную эффекторную клетку, например, аутологичную Т-клетку. В одном воплощении клетка представляет собой аллогенную иммунную эффекторную клетку, например, Т-клетку. В одном воплощении млекопитающее представляет собой человека, например, пациента с онкологическим заболеванием кроветворной системы. В другом аспекте изобретение относится к способу лечения млекопитающего, имеющего заболевание, связанное с экспрессией CLL-1 (например, пролиферативное заболевание, предраковое состояние и показание, относящееся к неонкологическому заболеванию, связанное с экспрессией CLL-1), включающему введение млекопитающему эффективного количества клеток, экспрессирующих молекулу CAR, например, клеток, экспрессирующих молекулу CAR, описанную в настоящем описании. В одном воплощении млекопитающее представляет собой человека, например, пациента с онкологическим заболеванием кроветворной системы.

В одном воплощении заболевание является заболеванием, описанным в настоящем описании. В одном воплощении заболевание, связанное с экспрессией CLL-1, выбирают из рака кроветворной системы, такого как лейкоз, включая, но не ограничиваясь перечисленным, острый миелоидный лейкоз (AML), миелодиспластический синдром, миелопролиферативные неоплазмы, хронический миелоидный лейкоз (CML), неоплазму бластно-плазмоцитоидных дендритных клеток, и заболевания, связанного с экспрессией CLL-1, включая, но не ограничиваясь перечисленным, атипичные и/или неклассические раки, злокачественности, предраковые состояния или пролиферативные заболевания с экспрессированием CLL-1, и их комбинации. В одном воплощении заболевание, связанное с экспрессией CLL-1, представляет собой рак кроветворной системы, выбранный из группы, включающей один или несколько острых лейкозов, включая, но не ограничиваясь перечисленным, острый миелогенный лейкоз (или острый миелоидный лейкоз, AML), хронический миелогенный лейкоз (или хронический миелоидный лейкоз, CML), острый лимфоидный лейкоз (или острый лимфоцитарный лейкоз, ALL), хронический лимфоидный лейкоз (или хронический лимфоцитарный лейкоз, CLL) и миелодиспластический синдром, В-клеточный острый лимфоидный лейкоз («BALL» или острый лимфобластный В-клеточный лейкоз), Т-клеточный острый лимфоидный лейкоз («TALL» или острый лимфобластный Т-клеточный лейкоз), острый лимфоидный лейкоз (ALL); один или несколько хронических лейкозов, включая, но не ограничиваясь перечисленным, хронический миелогенный лейкоз (CML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL); другие онкологические заболевания кроветворной системы или гематологические состояния, включая, но не ограничиваясь перечисленным, В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, неоплазму бластно-плазмоцитоидных дендритных клеток, лимфомы, включая, но не ограничиваясь перечисленным, множественную миелому, неходжкинскую лимфому, лимфому Беркитта, мелкоклеточную фолликулярную лимфому и крупноклеточную фолликулярную лимфому, диффузную В-клеточную крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому, волосатоклеточный лейкоз, мелкоклеточную или крупноклеточную фолликулярную лимфому, злокачественные лимфопролиферативные состояния, MALT лимфому, лимфому из клеток мантийной зоны, лимфому маргинальной зоны, миелодисплазию и миелодиспластический синдром, лимфому Ходжкина, плазмобластную лимфому, неоплазму бластно-плазмоцитоидных дендритных клеток,

плазмочитарную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема и «предлейкоз», которые представляют собой разнообразный набор гематологических состояний, объединенных неэффективным продуцированием (или дисплазией) миелоидных клеток крови, и заболевания, связанного с экспрессией CLL-1, включая, но не ограничиваясь

5 перечисленным, атипичные и/или неклассические раки, злокачественности, предраковые состояния или пролиферативные заболевания с экспрессированием CLL-1, и их комбинации.

В другом аспекте изобретение относится к способу укрепления общего состояния субъекта перед трансплантацией клеток, включающему введение субъекту эффективного

10 количества клеток, включающих молекулу CAR, раскрытую в настоящем описании. В одном воплощении трансплантация клеток представляет собой трансплантацию стволовых клеток. Трансплантация стволовых клеток представляет собой трансплантацию кроветворных стволовых клеток или трансплантацию костного мозга. В одном воплощении трансплантация клеток является аллогенной или аутологичной.

15 В одном воплощении укрепление общего состояния субъекта перед трансплантацией клеток включает снижение числа CLL-1-экспрессирующих клеток у субъекта. Экспрессирующие CLL-1 у субъекта клетки представляют собой здоровые CLL-1-экспрессирующие клетки или раковые CLL-1-экспрессирующие клетки, и в некоторых случаях укреплением общего состояния субъекта будет снижение как здоровых CLL-1-экспрессирующих клеток, так и раковых CLL-1-экспрессирующих клеток перед

20 трансплантацией клеток.

В одном воплощении клетки, экспрессирующие молекулу CAR, например, молекулу CAR, описанную в настоящем описании, вводят в комбинации с агентом, который повышает эффективность клеток, экспрессирующих молекулу CAR, например, агентом,

25 описанным в настоящем описании.

В одном воплощении клетки, экспрессирующие молекулу CAR, например, молекулу CAR, описанную в настоящем описании, вводят в комбинации с малой усиливающей иммунитет дозой ингибитора mTOR. Без желания привязываться к теории, полагают, что лечение малой усиливающей иммунитет дозой (например, дозой, которая

30 недостаточна для полной супрессии иммунной системы, но достаточна для улучшения иммунной функции) сопровождается снижением числа PD-1-положительных клеток или увеличением PD-1-отрицательных клеток. PD-1-Положительные Т-клетки, но не PD-1-отрицательные клетки Т-клетки, могут быть истощены путем соединения с клетками, которые экспрессируют лиганд PD-1, например, PD-L1 или PD-L2.

35 В воплощении такой подход можно использовать для оптимизации работоспособности клеток CAR у субъекта, описанных в настоящем описании. Без желания привязываться к теории, полагают, что в воплощении работоспособность эндогенных немодифицированных иммунных клеток, например, Т-клеток, улучшается. Без желания привязываться к теории, полагают, что в воплощении работоспособность

40 CLL-1-экспрессирующих клеток CAR улучшается. В других воплощениях клетки, например, Т-клетки, которые являются или будут экспрессировать CAR, можно обработать ex vivo путем контакта с неким количеством ингибитора mTOR, который повышает число PD-1-отрицательных иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток, или повышает отношение PD-1-отрицательные иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки/PD-1-положительные иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки.

В воплощении введение малой усиливающей иммунитет дозы ингибитора mTOR, например, аллостерического ингибитора, например, RAD001, или каталитического

ингибитора, начинают до введения CAR-экспрессирующих клеток, описанных в настоящем описании, например, Т-клеток. В воплощении CAR-клетки вводят через достаточное время или достаточной дозировки ингибитора mTOR, так что уровень PD-1-отрицательных иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток, или отношение PD-1-отрицательные иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки/PD-1-положительные иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки, по меньшей мере временно возрастает.

В воплощении изобретение относится к ингибитору mTOR для применения при лечении субъекта, при котором указанный ингибитор mTOR усиливает иммунную реакцию у указанного субъекта, и при котором указанный субъект получил, получает или близок к получению иммунных эффекторных клеток, которые экспрессируют CLL-1-CAR, как описано в настоящем описании.

В воплощении клетки, например, Т-клетки, сконструированные для экспрессии CAR, собирают через достаточное время или после достаточного дозирования малой повышающей иммунитет дозы ингибитора mTOR, так что уровень PD-1-отрицательных иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток, или отношение PD-1-отрицательные иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки/PD-1-положительные иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки, у субъекта или собранных у субъекта по меньшей мере временно возрастает.

В одном воплощении клетки, экспрессирующие молекулу CAR, например, молекулу CAR, описанную в настоящем описании, вводят в комбинации с агентом, который уменьшает побочное действие, связанное с введением клеток, экспрессирующих молекулу CAR, например, агентом, описанным в настоящем описании.

В одном воплощении клетки, экспрессирующие молекулу CAR, например, молекулу CAR, описанную в настоящем описании, вводят в комбинации с агентом, который лечит заболевание, связанное с CLL-1, например, агентом, описанным в настоящем описании.

В другом воплощении клетки, экспрессирующие молекулу CAR, например, молекулу CAR, описанную в настоящем описании, вводят в комбинации с химиотерапевтическим средством, например, химиотерапевтическим средством, описанным в настоящем описании.

В воплощении химиотерапевтическое средство вводят до введения клеток, экспрессирующих молекулу CAR, например, молекулу CAR, описанную в настоящем описании. Например, в схемах приема терапевтических средств, по которым желательно более одного введения химиотерапевтического средства, прием химиотерапевтического средства начинают или завершают до введения клеток, экспрессирующих молекулу CAR, например, молекулу CAR, описанную в настоящем описании.

В воплощениях химиотерапевтическое средство вводят по меньшей мере за 5 дней, 10 дней, 15 дней, 30 дней до введения клеток, экспрессирующих молекулу CAR. В воплощениях химиотерапевтическое средство представляет собой химиотерапевтическое средство, которое повышает экспрессию CLL-1 на раковых клетках, например, опухолевых клетках, например, по сравнению с экспрессией CLL-1 на здоровых или нераковых клетках. Например, химиотерапевтическое средство представляет собой цитарабин (Ara-C). В воплощениях комбинацию химиотерапии и клеток, экспрессирующих молекулу CAR, описанную в настоящем описании, применяют для лечения рака кроветворной системы, например, лейкоза, например, AML, или минимального остаточного заболевания (MRD) рака кроветворной системы, описанного в настоящем описании.

В другом аспекте изобретение относится к изолированной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR по изобретению, изолированной молекуле полипептида CAR по изобретению, вектору, включающему CAR по изобретению, и клетке,

включающей CAR по изобретению, для применения в качестве лекарственного средства, например, как описано в настоящем описании. В другом аспекте изобретение относится к изолированной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR по изобретению, изолированной молекуле полипептида CAR по изобретению, вектору, включающему

5 CAR по изобретению, и клетке, включающей CAR по изобретению, для применения при лечении заболевания с экспрессией CLL-1, например, заболевания с экспрессией CLL-1, как описано в настоящем описании.

Другие особенности и воплощения вышеуказанных композиций и способов включают один или несколько пунктов из перечисленных далее.

10 В некоторых воплощениях молекула CAR к CLL-1 (например, CAR-нуклеиновой кислоты к CLL-1 или CAR-полипептида к CLL-1, описанным в настоящем описании) или CLL-1-связывающий домен, описанный в настоящем описании, включают один, два или три CDR из варибельного участка тяжелой цепи (например, HC CDR1, HC CDR2 и/или HC CDR3), представленные в таблице 3, и/или один, два или три CDR из

15 варибельного участка легкой цепи (например, LC CDR1, LC CDR2 и/или LC CDR3) из CLL-1 CAR-1, CLL-1 CAR-2, CLL-1 CAR-3, CLL-1 CAR-4, CLL-1 CAR-5, CLL-1 CAR-6, CLL-1 CAR-7, CLL-1 CAR-8, CLL-1 CAR-9, CLL-1 CAR-10, CLL-1 CAR-11, CLL-1 CAR-12, CLL-1 CAR-13 или 181268, представленные в таблице 4; или последовательность по существу идентичную (например, на 95-99% идентичную вышеуказанным

20 последовательностям или с до 5, 4, 3, 2 или 1 изменением аминокислот, например, заменой (например, консервативной заменой)) любой из вышеуказанных последовательностей.

В некоторых воплощениях молекула CAR к CLL-1 (например, CAR-нуклеиновой кислоты к CLL-1 или CAR-полипептида к CLL-1, описанные в настоящем описании)

25 или CLL-1-связывающий домен, описанный в настоящем описании, включают один, два или три CDR из варибельного участка тяжелой цепи (например, HC CDR1, HC CDR2 и/или HC CDR3), представленные в таблице 5, и/или один, два или три CDR из варибельного участка легкой цепи (например, LC CDR1, LC CDR2 и/или LC CDR3) из

30 CLL-1 CAR-1, CLL-1 CAR-2, CLL-1 CAR-3, CLL-1 CAR-4, CLL-1 CAR-5, CLL-1 CAR-6, CLL-1 CAR-7, CLL-1 CAR-8, CLL-1 CAR-9, CLL-1 CAR-10, CLL-1 CAR-11, CLL-1 CAR-12, CLL-1 CAR-13 или 181268, представленные в таблице 6; или последовательность по существу идентичную (например, на 95-99% идентичную вышеуказанным

последовательностям или с до 5, 4, 3, 2 или 1 изменением аминокислот, например, заменой (например, консервативной заменой)) любой из вышеуказанных

35 последовательностей.

В некоторых воплощениях молекула CAR для CLL-1 (например, CAR-нуклеиновой кислоты для CLL-1 или CAR-полипептида для CLL-1, описанные в настоящем описании) или CLL-1-связывающий домен, описанный в настоящем описании, включают один, два или три CDR из варибельного участка тяжелой цепи (например, HC CDR1, HC

40 CDR2 и/или HC CDR3), представленные в таблице 7, и/или один, два или три CDR из варибельного участка легкой цепи (например, LC CDR1, LC CDR2 и/или LC CDR3) из CLL-1 CAR-1, CLL-1 CAR-2, CLL-1 CAR-3, CLL-1 CAR-4, CLL-1 CAR-5, CLL-1 CAR-6, CLL-1 CAR-7, CLL-1 CAR-8, CLL-1 CAR-9, CLL-1 CAR-10, CLL-1 CAR-11, CLL-1 CAR-12, CLL-1 CAR-13 или 181268, представленные в таблице 8; или последовательность по

45 существу идентичную (например, на 95-99% идентичную вышеуказанным последовательностям или с до 5, 4, 3, 2 или 1 изменением аминокислот, например, заменой (например, консервативной заменой)) любой из вышеуказанных последовательностей.

В некоторых воплощениях молекула CAR, описанная в настоящем описании (например, CAR-нуклеиновой кислоты или CAR-полипептида), включает

(1) один, два или три CDR легкой цепи (LC), выбранные из одной из следующих групп:

(i) LC CDR1 SEQ ID NO: 156, LC CDR2 SEQ ID NO: 169 и LC CDR3 SEQ ID NO: 182

5 CLL-1-CAR-1;

(ii) LC CDR1 SEQ ID NO: 157, LC CDR2 SEQ ID NO: 170 и LC CDR3 SEQ ID NO: 183

CLL-1-CAR-2;

(iii) LC CDR1 SEQ ID NO: 158, LC CDR2 SEQ ID NO: 171 и LC CDR3 SEQ ID NO: 184

CLL-1-CAR-3;

10 (iv) LC CDR1 SEQ ID NO: 159, LC CDR SEQ ID NO: 172 и LC CDR3 SEQ ID NO: 185

CLL-1-CAR-4;

(v) LC CDR1 SEQ ID NO: 160, LC CDR2 SEQ ID NO: 173 и LC CDR3 SEQ ID NO: 186

CLL-1-CAR-5;

(vi) LC CDR1 SEQ ID NO: 161, LC CDR2 SEQ ID NO: 174 и LC CDR3 SEQ ID NO: 187

15 CLL-1-CAR-6;

(vii) LC CDR1 SEQ ID NO: 162, LC CDR2 SEQ ID NO: 175 и LC CDR3 SEQ ID NO: 188

CLL-1-CAR-7;

(viii) LC CDR1 SEQ ID NO: 163, LC CDR2 SEQ ID NO: 176 и LC CDR3 SEQ ID NO: 189

CLL-1-CAR-8; или

20 (ix) LC CDR1 SEQ ID NO: 164, LC CDR2 SEQ ID NO: 177 и LC CDR3 SEQ ID NO: 190

CLL-1-CAR-9;

(x) LC CDR1 SEQ ID NO: 165, LC CDR2 SEQ ID NO: 178 и LC CDR3 SEQ ID NO: 191

CLL-1-CAR-10;

(xi) LC CDR1 SEQ ID NO: 166, LC CDR2 SEQ ID NO: 179 и LC CDR3 SEQ ID NO: 192

25 CLL-1-CAR-11;

(xii) LC CDR1 SEQ ID NO: 167, LC CDR2 SEQ ID NO: 180 и LC CDR3 SEQ ID NO: 193

CLL-1-CAR-12;

(xiii) LC CDR1 SEQ ID NO: 168, LC CDR2 SEQ ID NO: 181 и LC CDR3 SEQ ID NO: 194

CLL-1-CAR-13;

30 (xiv) LC CDR1 SEQ ID NO: 202, LC CDR2 SEQ ID NO: 203 и LC CDR3 SEQ ID NO: 204

181286; и/или

(2) один, два или три CDR тяжелой цепи (HC), выбранные из одной из следующих групп:

(i) HC CDR1 SEQ ID NO: 117, HC CDR2 SEQ ID NO: 130 и HC CDR3 SEQ ID NO: 143

35 CLL-1-CAR-1;

(ii) HC CDR1 SEQ ID NO: 118, HC CDR2 SEQ ID NO: 131 и HC CDR3 SEQ ID NO: 144

CLL-1-CAR-2;

(iii) HC CDR1 SEQ ID NO: 119, HC CDR2 SEQ ID NO: 132 и HC CDR3 SEQ ID NO: 145

CLL-1-CAR-3;

40 (iv) HC CDR1 SEQ ID NO: 120, HC CDR2 SEQ ID NO: 133 и HC CDR3 SEQ ID NO: 146

CLL-1-CAR-4;

(v) HC CDR1 SEQ ID NO: 121, HC CDR2 SEQ ID NO: 134 и HC CDR3 SEQ ID NO: 147

CLL-1-CAR-5;

(vi) HC CDR1 SEQ ID NO: 122, HC CDR2 SEQ ID NO: 135 и HC CDR3 SEQ ID NO: 148

45 CLL-1-CAR-6;

(vii) HC CDR1 SEQ ID NO: 123, HC CDR2 SEQ ID NO: 136 и HC CDR3 SEQ ID NO: 149

CLL-1-CAR-7;

(viii) HC CDR1 SEQ ID NO: 124, HC CDR2 SEQ ID NO: 137 и HC CDR3 SEQ ID NO: 150

CLL-1-CAR-8; or

(ix) HC CDR1 SEQ ID NO: 125, HC CDR2 SEQ ID NO: 138 и HC CDR3 SEQ ID NO: 151
CLL-1-CAR-9;

(x) HC CDR1 SEQ ID NO: 126, HC CDR2 SEQ ID NO: 139 и HC CDR3 SEQ ID NO: 152
CLL-1-CAR-10;

(xi) HC CDR1 SEQ ID NO: 127, HC CDR2 SEQ ID NO: 140 и HC CDR3 SEQ ID NO: 153
CLL-1-CAR-11;

(xii) HC CDR1 SEQ ID NO: 128, HC CDR2 SEQ ID NO: 141 и HC CDR3 SEQ ID NO: 154
CLL-1-CAR-12;

(xiii) HC CDR1 SEQ ID NO: 129, HC CDR2 SEQ ID NO: 142 и HC CDR3 SEQ ID NO: 155
CLL-1-CAR-13;

(xiv) HC CDR1 SEQ ID NO: 199, HC CDR2 SEQ ID NO: 200 и HC CDR3 SEQ ID NO: 201
181286.

В некоторых воплощениях молекула CAR, описанная в настоящем описании
(например, CAR-нуклеиновой кислоты или CAR-полипептида), или CLL-1-связывающий
домен включают

(1) один, два или три CDR легкой цепи (LC), выбранные из одной из следующих групп:

(i) LC CDR1 SEQ ID NO: 356, LC CDR2 SEQ ID NO: 370 и LC CDR3 SEQ ID NO: 384
CLL-1-CAR-1;

(ii) LC CDR1 SEQ ID NO: 357, LC CDR2 SEQ ID NO: 371 и LC CDR3 SEQ ID NO: 385
CLL-1-CAR-2;

(iii) LC CDR1 SEQ ID NO: 358, LC CDR2 SEQ ID NO: 372 и LC CDR3 SEQ ID NO: 386
CLL-1-CAR-3;

(iv) LC CDR1 SEQ ID NO: 359, LC CDR2 SEQ ID NO: 373 и LC CDR3 SEQ ID NO: 387
CLL-1-CAR-4;

(v) LC CDR1 SEQ ID NO: 360, LC CDR2 SEQ ID NO: 374 и LC CDR3 SEQ ID NO: 388
CLL-1-CAR-5;

(vi) LC CDR1 SEQ ID NO: 361, LC CDR2 SEQ ID NO: 375 и LC CDR3 SEQ ID NO: 389
CLL-1-CAR-6;

(vii) LC CDR1 SEQ ID NO: 362, LC CDR2 SEQ ID NO: 376 и LC CDR3 SEQ ID NO: 390
CLL-1-CAR-7;

(viii) LC CDR1 SEQ ID NO: 363, LC CDR2 SEQ ID NO: 377 и LC CDR3 SEQ ID NO: 391
CLL-1 CAR-8; или

(ix) LC CDR1 SEQ ID NO: 364, LC CDR2 SEQ ID NO: 378 и LC CDR3 SEQ ID NO: 392
CLL-1-CAR-9;

(x) LC CDR1 SEQ ID NO: 365, LC CDR2 SEQ ID NO: 379 и LC CDR3 SEQ ID NO: 393
CLL-1-CAR-10;

(xi) LC CDR1 SEQ ID NO: 366, LC CDR2 SEQ ID NO: 380 и LC CDR3 SEQ ID NO: 394
CLL-1-CAR-11;

(xii) LC CDR1 SEQ ID NO: 367, LC CDR2 SEQ ID NO: 381 и LC CDR3 SEQ ID NO: 395
CLL-1-CAR-12;

(xiii) LC CDR1 SEQ ID NO: 368, LC CDR2 SEQ ID NO: 382 и LC CDR3 SEQ ID NO: 396
CLL-1-CAR-13;

(xiv) LC CDR1 SEQ ID NO: 369, LC CDR2 SEQ ID NO: 383 и LC CDR3 SEQ ID NO: 397
of 181286; и/или

(2) один, два или три CDR тяжелой цепи (HC), выбранные из одной из следующих
групп:

(i) HC CDR1 SEQ ID NO: 314, HC CDR2 SEQ ID NO: 328 и HC CDR3 SEQ ID NO: 342

CLL-1-CAR-1;

(ii) HC CDR1 SEQ ID NO: 315, HC CDR2 SEQ ID NO: 329 и HC CDR3 SEQ ID NO: 343

CLL-1-CAR-2;

(iii) HC CDR1 SEQ ID NO: 316, HC CDR2 SEQ ID NO: 330 и HC CDR3 SEQ ID NO: 344

5 CLL-1-CAR-3;

(iv) HC CDR1 SEQ ID NO: 317, HC CDR2 SEQ ID NO: 331 и HC CDR3 SEQ ID NO: 345

CLL-1-CAR-4;

(v) HC CDR1 SEQ ID NO: 318, HC CDR2 SEQ ID NO: 332 и HC CDR3 SEQ ID NO: 346

CLL-1-CAR-5;

10 (vi) HC CDR1 SEQ ID NO: 319, HC CDR2 SEQ ID NO: 333 и HC CDR3 SEQ ID NO: 347

CLL-1-CAR-6;

(vii) HC CDR1 SEQ ID NO: 320, HC CDR2 SEQ ID NO: 334 и HC CDR3 SEQ ID NO: 348

CLL-1-CAR-7;

(viii) HC CDR1 SEQ ID NO: 321, HC CDR2 SEQ ID NO: 335 и HC CDR3 SEQ ID NO: 349

15 CLL-1 CAR-8; или

(ix) HC CDR1 SEQ ID NO: 322, HC CDR2 SEQ ID NO: 336 и HC CDR3 SEQ ID NO: 350

CLL-1-CAR-9;

(x) HC CDR1 SEQ ID NO: 323, HC CDR2 SEQ ID NO: 337 и HC CDR3 SEQ ID NO: 351

CLL-1-CAR-10;

20 (xi) HC CDR1 SEQ ID NO: 324, HC CDR2 SEQ ID NO: 338 и HC CDR3 SEQ ID NO: 352

CLL-1-CAR-11;

(xii) HC CDR1 SEQ ID NO: 325, HC CDR2 SEQ ID NO: 339 и HC CDR3 SEQ ID NO: 353

CLL-1-CAR-12;

(xiii) HC CDR1 SEQ ID NO: 326, HC CDR2 SEQ ID NO: 340 и HC CDR3 SEQ ID NO: 354

25 CLL-1 CAR-13;

(xiv) HC CDR1 SEQ ID NO: 327, HC CDR2 SEQ ID NO: 341 и HC CDR3 SEQ ID NO: 355
181286.

В некоторых воплощениях молекула CAR, описанная в настоящем описании (например, CAR-нуклеиновой кислоты или CAR-полипептида), включает

30 (1) один, два или три CDR легкой цепи (LC), выбранные из одной из следующих групп:

(i) LC CDR1 SEQ ID NO: 440, LC CDR2 SEQ ID NO: 454 и LC CDR3 SEQ ID NO: 468

CLL-1-CAR-1;

(ii) LC CDR1 SEQ ID NO: 441, LC CDR2 SEQ ID NO: 455 и LC CDR3 SEQ ID NO: 469

CLL-1-CAR-2;

35 (iii) LC CDR1 SEQ ID NO: 442, LC CDR2 SEQ ID NO: 456 и LC CDR3 SEQ ID NO: 470

CLL-1-CAR-3;

(iv) LC CDR1 SEQ ID NO: 443, LC CDR2 SEQ ID NO: 457 и LC CDR3 SEQ ID NO: 471

CLL-1-CAR-4;

(v) LC CDR1 SEQ ID NO: 444, LC CDR2 SEQ ID NO: 458 и LC CDR3 SEQ ID NO: 472

40 CLL-1-CAR-5;

(vi) LC CDR1 SEQ ID NO: 445, LC CDR2 SEQ ID NO: 459 и LC CDR3 SEQ ID NO: 473

CLL-1-CAR-6;

(vii) LC CDR1 SEQ ID NO: 446, LC CDR2 SEQ ID NO: 460 и LC CDR3 SEQ ID NO: 474

CLL-1-CAR-7;

45 (viii) LC CDR1 SEQ ID NO: 447, LC CDR2 SEQ ID NO: 461 и LC CDR3 SEQ ID NO: 475

CLL-1-CAR-8; или

(ix) LC CDR1 SEQ ID NO: 448, LC CDR2 SEQ ID NO: 462 и LC CDR3 SEQ ID NO: 476

CLL-1-CAR-9;

(x) LC CDR1 SEQ ID NO: 449, LC CDR2 SEQ ID NO: 463 и LC CDR3 SEQ ID NO: 477
CLL-1-CAR-10;

(xi) LC CDR1 SEQ ID NO: 450, LC CDR2 SEQ ID NO: 464 и LC CDR3 SEQ ID NO: 478
CLL-1-CAR-11;

5 (xii) LC CDR1 SEQ ID NO: 451, LC CDR2 SEQ ID NO: 465 и LC CDR3 SEQ ID NO: 479
CLL-1-CAR-12;

(xiii) LC CDR1 SEQ ID NO: 452, LC CDR2 SEQ ID NO: 466 и LC CDR3 SEQ ID NO: 480
CLL-1-CAR-13;

(xiv) LC CDR1 SEQ ID NO: 453, LC CDR2 SEQ ID NO: 467 и LC CDR3 SEQ ID NO: 481
10 181286; и/или

(2) один, два или три CDR тяжелой цепи (HC), выбранные из одной из следующих групп:

(i) HC CDR1 SEQ ID NO: 398, HC CDR2 SEQ ID NO: 412 и HC CDR3 SEQ ID NO: 426
CLL-1-CAR-1;

15 (ii) HC CDR1 SEQ ID NO: 399, HC CDR2 SEQ ID NO: 413 и HC CDR3 SEQ ID NO: 427
CLL-1-CAR-2;

(iii) HC CDR1 SEQ ID NO: 400, HC CDR2 SEQ ID NO: 414 и HC CDR3 SEQ ID NO: 428
CLL-1-CAR-3;

(iv) HC CDR1 SEQ ID NO: 401, HC CDR2 SEQ ID NO: 415 и HC CDR3 SEQ ID NO: 429
20 CLL-1 -AR-4;

(v) HC CDR1 SEQ ID NO: 402, HC CDR2 SEQ ID NO: 416 и HC CDR3 SEQ ID NO: 430
CLL-1-CAR-5;

(vi) HC CDR1 SEQ ID NO: 403, HC CDR2 SEQ ID NO: 417 и HC CDR3 SEQ ID NO: 431
CLL-1-CAR-6;

25 (vii) HC CDR1 SEQ ID NO: 404, HC CDR2 SEQ ID NO: 418 и HC CDR3 SEQ ID NO: 432
CLL-1-CAR-7;

(viii) HC CDR1 SEQ ID NO: 405, HC CDR2 SEQ ID NO: 419 и HC CDR3 SEQ ID NO: 433
CLL-1-CAR-8; или

(ix) HC CDR1 SEQ ID NO: 406, HC CDR2 SEQ ID NO: 420 и HC CDR3 SEQ ID NO: 434
30 CLL-1-CAR-9;

(x) HC CDR1 SEQ ID NO: 407, HC CDR2 SEQ ID NO: 421 и HC CDR3 SEQ ID NO: 435
CLL-1-CAR-10;

(xi) HC CDR1 SEQ ID NO: 408, HC CDR2 SEQ ID NO: 422 и HC CDR3 SEQ ID NO: 436
CLL-1-CAR-11;

35 (xii) HC CDR1 SEQ ID NO: 409, HC CDR2 SEQ ID NO: 423 и HC CDR3 SEQ ID NO: 437
CLL-1-CAR-12;

(xiii) HC CDR1 SEQ ID NO: 410, HC CDR2 SEQ ID NO: 424 и HC CDR3 SEQ ID NO: 438
CLL-1-CAR-13;

(xiv) HC CDR1 SEQ ID NO: 411, HC CDR2 SEQ ID NO: 425 и HC CDR3 SEQ ID NO: 439
40 181286.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют те же значения, какие им обычно придают специалисты в данной области техники, к которым имеет отношение настоящее изобретение. Хотя способы и материалы, схожие или эквивалентные описанным в настоящем описании, можно
45 использовать при практическом или опытном использовании настоящего изобретения, ниже описаны подходящие способы и материалы. Все публикации, заявки на патент, патенты и другие ссылки, упомянутые в настоящем описании, полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. Кроме того, материалы, способы

и примеры являются только пояснительными и не предназначены для ограничения. Заголовки, подзаголовки или нумерованные или обозначенные буквами элементы, например, (a), (b), (i) и т.д., присутствуют только для облегчения чтения. Использование заголовков или нумерованных или обозначенных буквами элементов в настоящем документе не требует, чтобы стадии или элементы выполнялись в алфавитном порядке или чтобы стадии или элементы обязательно отделялись друг от друга. Другие особенности, цели и преимущества изобретения будут очевидны из описания и чертежей и из формулы изобретения.

Краткое описание чертежей

Приведенное далее подробное описание предпочтительных воплощений изобретения будут лучше пониматься при чтении в сочетании с прилагаемыми чертежами. В целях пояснения изобретения на чертежах показаны воплощения, которые предпочтительны в настоящее время. Однако следует представлять, что изобретение не ограничивается точным определенным порядком и оснащением воплощений, показанных на чертежах.

Фигура 1, включающая фигуры 1А, 1В и 1С, представляет собой ряд отображений, показывающих уровни люциферазы в мишень-положительных (PL21, THP1, HL60, U937) или мишень-отрицательных (K562) клеточных линиях, смешанных с клеточной линией JNL, трансдуцированной анти-CLL-1 CAR.

Фигура 2, включающая фигуры 2А, 2В и 2С, представляет собой ряд отображений, показывающих экспрессию CAR, определенную FACS, в клеточной линии JNL, трансдуцированной анти-CLL-1 CAR.

Фигура 3, включающая фигуры 3А и 3В, представляет собой ряд отображений, показывающих гистограммы относительной интенсивности флуоресценции по FACS, показавшему процент трансдуцированных Т-клеток. Фигура 3А показывает детекцию экспрессии CART в первичных Т-клетках с использованием белка L. Фигура 3В показывает детекцию экспрессии CART в первичных Т-клетках с использованием рекомбинантного белка CLL-1.

Фигура 4, включающая фигуры 4А, 4В и 4С, представляет собой ряд отображений, показывающих анти-CLL-1-CART-клеточный киллинг люциферизованных клеток PL21 (фиг. 4А), HL60 (фиг. 4В) и U87 (фиг. 4С).

Фигура 5, включающая фигуры 5А, 5В и 5С, представляет собой ряд отображений, показывающих продуцирование цитокинов в клетках CART-CLL-1. Нетрансдуцированные Т-клетки (UTD) используют в качестве неспецифического контроля для фоновых действий Т-клеток. Измеряют TNF-альфа (фиг. 5А), IL-2 (фиг. 5В) и интерферон (IFN)-гамма (фиг. 5С).

Фигура 6 представляет изображение, показывающее, что CLL-1 экспрессируется в большинстве первичных образцов от пациентов с AML (AML бласты «заперты» с использованием стандартных характеристик бокового разброса $^{low}CD45^{dim}$). CLL-1 измеряют проточной цитометрией с использованием коммерчески доступных антител (клон HIM3-4, eBioscience).

Фигура 7, включающая фигуры 7А и 7В, представляет собой ряд отображений, показывающих эффективность трансдукции Т-клеток, трансдуцированных CAR.

Фигура 8, включающая фигуры 8А и 8В, представляет собой ряд отображений, показывающих, что CLL1-CART клетки подвергают специфической дегрануляции CLL1+ клеточные линии и первичные образцы AML. Дегрануляцию CD107 измеряют проточной цитометрией (фиг. 8А). CLL1-CART клетки подвергают специфической дегрануляции THP1 и первичные образцы AML и не подвергают контрольную клеточную линию (фиг. 8В).

Фигура 9, включающая фигуры 9А и 9В, представляет собой ряд отображений, показывающих CLL1-CART клетки, продуцирующие TNF- α после инкубации с CLL1+ клеточной линией и первичными образцами AML.

5 Фигура 10, включающая фигуры 10А и 10В, представляет собой ряд отображений, показывающих CLL1-CART клетки, продуцирующие IL-2 после инкубации с CLL1+ клеточной линией и первичными образцами AML.

Фигура 11, включающая фигуры 11-11D, представляет собой ряд отображений, показывающих CLL1-CART клетки, специфически убивающие с CLL1+ клеточные линии MOLM14 и THP-1 и первичные образцы AML. CLL1-CART клетки приводят к
10 специфическому лизису MOLM14 (фиг. 11D), THP-1 (фиг. 11А) и первичного образца AML (фиг. 11В), и не приводят к лизису контрольной клеточной линии JEKO (фиг. 11С), при указанных отношениях Е:Т.

Фигура 12, включающая фигуры 12А и 12В, представляет собой ряд отображений, показывающих быструю пролиферацию CLL-1-CART клеток в ответ на MOLM14, THP-1
15 и первичные образцы AML.

Фигура 13 представляет собой изображение, иллюстрирующее схематическую диаграмму анализа токсичности кроветворных стволовых клеток с использованием аутологичных ксенотрансплантатов.

Фигура 14, включающая фигуры 14А, 14В и 14С, представляет собой ряд
20 отображений, показывающих, что CLL-1 экспрессируется на различных миелоидных клеточных линиях и В-клетках у гуманизированных мышей. Показаны характерные схемы FACS анализа периферической крови одной мыши (фиг. 14А). CLL-1 экспрессируется на моноцитах (CD14+ клетки), миелоидных клетках (CD33+ и CD123+ клетки), В-клетках (CD19+ клетки), но не на тромбоцитах (CD41+ клетки) или Т-клетках
25 (CD3+ клетки). Показаны характерные гистограммы (фиг. 14В). Показано схематическое представление результатов анализа периферической крови у 24 мышей (фиг. 14С).

Фигура 15, включающая фигуры 15А, 15В, 15С и 15D, представляет собой ряд отображений, показывающих, что CLL-1 экспрессируется на различных миелоидных клеточных линиях и В-клетках у гуманизированных мышей.

30 Фигура 16, включающая фигуры 16А, 16В, 16С и 16D, представляет собой ряд отображений, показывающих, что CLL-1 экспрессируется на различных миелоидных клетках-предшественниках и стволовых кроветворных клетках у гуманизированных мышей.

Фигура 17 представляет собой принципиальную схему анализа на токсичность
35 стволовых кроветворных клеток CLL-1-CART клеток с использованием ксенотрансплантатов гуманизированной иммунной системы (HIS).

Фигура 18, включающая фигуры 18А и 18В, представляет собой ряд отображений, показывающих анализ костного мозга через 4 недели после инфузии CLL-1-CART клеток. Анализ методом проточной цитометрии выполнен в компоненте CD34+CD38-
40 (кроветворные стволовые клетки) (фиг. 18А) и компоненте CD34+CD38+ (клетки-предшественники) (фиг. 18В).

Фигура 19, включающая фигуры 19А, 19В, 19С, 19D и 19Е, представляет собой ряд отображений, показывающих анализ костного мозга через 4 недели после Т-клеток.

Фигура 20 представляет собой изображение результатов анализа костного мозга у
45 мышей HIS через 4 недели после Т-клеток. Показана токсичность кроветворных стволовых клеток CLL-1-CART клеток с использованием трансплантатов HIS.

Фигура 21, включающая фигуры 21А, 21В, 21С, 21D и 21Е, представляет собой ряд отображений, показывающих анализ костного мозга у мышей HIS через 4 недели после

Т-клеток. Показаны характерные отображения костного мозга мышей, обработанных различными CART клетками.

Фигура 22, включающая фигуры 22А и 22В, представляет собой ряд гистограмм, показывающих относительную интенсивность флуоресценции из FACS анализа, показывающую процент трансдуцированных Т-клеток. Фигура 22А показывает детекцию экспрессии CART в первичных Т-клетках с использованием белка L. 22В показывает детекцию экспрессии CART в первичных Т-клетках с использованием рекомбинантного белка CLL-1.

Фигура 23, включающая фигуры 23А и 23В, представляет собой две диаграммы, показывающие способность к пролиферации клеток CLL-1-CART при выращивании с клетками-мишенями.

Фигура 24 представляет собой график, показывающий развитие болезни AML на модели с ксенотрансплантатом PL-21-luc после обработки CLL-1-CART клетками. Средняя биолюминесценция (+/- SEM) опухолевых клеток, показывающая нагрузку на все животное, показана в виде фотон/секунда (ф/с) ROI (интересующий участок), которым является вся мышь.

Фигура 25, включающая фигуры 25А и 25В, представляет собой две диаграммы, показывающие количественное определение $CD4^+$ (фиг. 25А) и $CD8^+$ (фиг. 25В) CAR⁺ Т-клеток в периферической крови мышей с опухолью PL-21-luc.

Фигура 26, включающая фигуры 26А, 26В, 26С и 26D, представляет собой столбиковую диаграмму количественного определения $CD4^+$ Т-клеток (фиг. 26А), $CD4^+$ CLL-1-CAR-экспрессирующих Т-клеток (фиг. 26В), $CD8^+$ Т-клеток (фиг. 26С) и $CD8^+$ CLL-1-CAR-экспрессирующих Т-клеток (фиг. 26D) в костном мозгу мышей с опухолью PL-21-luc. Показано среднее число Т-клеток (+/- SEM) на миллион клеток костного мозга. Значимость вычисляют однофакторным ANOVA и выражают в виде * $P<0,05$ и ** $P<0,01$.

Фигура 27, включающая фигуры 27А, 27В, 27С и 27D, представляет собой столбиковую диаграмму количественного определения $CD4^+$ Т-клеток (фиг. 27А), $CD4^+$ CLL-1-CAR-экспрессирующих Т-клеток (фиг. 27В), $CD8^+$ Т-клеток (фиг. 27С) и the $CD8^+$ CLL-1-CAR-экспрессирующих Т-клеток (фиг. 27D) в селезенке мышей с опухолью PL-21-luc. Показано среднее число Т-клеток (+/- SEM) на миллион спленоцитов. Значимость вычисляют однофакторным ANOVA и выражают в виде * $P<0,05$ и ** $P<0,01$.

Фигура 28, включающая фигуры 28А, 28В, 28С и 28D, показывает, что лечение с индукционной химиотерапией и затем CLL-1-CAR-клетками приводит к уничтожению лейкоза в первичных ксенотрансплантатах AML. Фигура 28А является схематической иллюстрацией экспериментальной схемы комбинированной терапии из химиотерапии и CLL-1-CAR-клеток в первичных ксенотрансплантатах AML. Фигура 28В представляет собой столбиковую диаграмму, показывающую среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) CLL-1 в лейкозных клетках (компаратмент живых huCD495dim). Фигура 28С представляет собой график, показывающий количественное определение числа лейкозных бластов в периферической крови на 1 мкл периферической крови (среднее +/- SD) в различные моменты времени после инъекции AML как указано. Стрелки обозначают введение Ага-С (тонкие стрелки) и введение Т-клеток (нетрансдуцированных или CLL-1-CAR-экспрессирующих Т-клеток, толстые стрелки). Фигура 28D представляет собой график, показывающий продолжительность существования трансплантатов AML.

Фигура 29, включающая фигуры 29А, 29В, 29С, 29D и 29Е, показывает различные

конфигурации отдельного вектора, например, где shPHK регулируется U6 положительно или отрицательно CAR-кодирующими элементами, регулируемые EF1-альфа. В примерах конструкций, изображенных на фиг. 29А и 29В, транскрипция происходит через промоторы U6 и EF1-альфа в одном и том же направлении. В примерах

5 конструкций, изображенных на фиг. 29С и 29D, транскрипция происходит через промоторы U6 и EF1-альфа в различных направлениях. На фигуре 29Е shPHK (и соответствующий промотор U6) находится в первом векторе, и CAR (и соответствующий промотор EF1-альфа) находится во втором векторе.

Фигура 30 отображает структуры двух примеров конфигураций RCAR.

10 Антигенсвязывающие члены включают антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и домен-переключатель. Внутриклеточные связывающие элементы включают домен-переключатель, костимулирующий сигнальный домен и первичный сигнальный домен. Две конфигурации показывают, что первый и второй домены-переключатели, описанные в настоящем описании, могут находиться в различной ориентации по

15 отношению к антигенсвязывающему элементу и внутриклеточному связывающему элементу. В настоящем описании дополнительно описаны другие конфигурации RCAR.

Фигура 31 показывает, что пролиферация CAR-экспрессирующих трансдуцированных Т-клеток усиливается малой дозой в системе культивирования клеток. CART сокультивируются с клетками Nalm-6 в присутствии различных концентраций RAD001.

20 Число CAR-положительных CD3-положительных Т-клеток (черные столбики) и всех Т-клеток (светлые столбики) оценивают через 4 дня после сокультивирования.

Фигура 32 отображает измерения роста опухоли клеток NALM-6-luc с ежедневным дозированием 0,3, 1, 3 и 10 мкг/кг (мкг) RAD001 или дозированием среды. Кружочки относятся к среде; квадраты обозначают дозу RAD001 10 мкг/кг; треугольники

25 обозначают дозу RAD001 3 мкг/кг; перевернутые треугольники обозначают дозу RAD001 1 мкг/кг; и ромбы обозначают дозу RAD001 0,3 мкг/кг.

Фигура 33, включающая фигуры 33А и 33В, показывает фармакокинетические кривые, показывающие количество RAD001 в крови мышей NSG с опухолями NALM6. Фиг. 33А показывает РК в день 0 после первой дозы RAD001. Фиг. 33В показывает РК

30 в день 14 после последней дозы RAD001. Ромбы обозначают дозу RAD001 0,3 мкг/кг; квадраты обозначают дозу RAD001 1 мкг/кг; треугольники обозначают дозу RAD001 3 мкг/кг; и х обозначают дозу RAD001 10 мкг/кг.

Фигура 34, включающая фигуры 34А и 34В, показывает пролиферацию *in vivo* гуманизированных CD19-CART клеток с дозированием RAD001 и без него. Малые дозы RAD001 (0,003 мкг/кг) ежедневно ведут к усилению пролиферации CAR-Т клеток выше

35 нормального уровня пролиферации huCAR19. Фигура 34А показывает CD4⁺ CAR Т-клетки; фиг. 34В показывает CD8⁺ CAR Т-клетки. Кружочки обозначают PBS; квадраты обозначают huCTL019; треугольники обозначают huCTL019 с 3 мкг/кг RAD001; перевернутые треугольники обозначают huCTL019 с 0,3 мкг/кг RAD001; ромбы обозначают huCTL019 с 0,03 мкг/кг RAD001; и темные кружочки обозначают huCTL019 с 0,003 мкг/кг RAD001.

Подробное описание

Определения

45 Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют те же самые значения, какие им обычно придают специалисты в данной области техники, к которым имеет отношение изобретение.

Неопределенные артикли единственного числа относятся к одному или более чем одному (т.е., по меньшей мере одному) из грамматических объектов работы. Как пример,

«(an) элемент» обозначает один элемент или более одного элемента.

Термин «примерно», когда относится к измеряемой величине, такой как количество, протяженность во времени и т.п., предназначен для включения вариаций $\pm 20\%$, или в некоторых случаях $\pm 10\%$; или в некоторых случаях $\pm 5\%$; или в некоторых случаях $\pm 1\%$; или в некоторых случаях $\pm 0,1\%$ от указанной величины, когда такие вариации подходят для раскрытых способов.

Термин «химерный антигенный рецептор» или, с другой стороны, «CAR» относится к рекомбинантной полипептидной конструкции, включающей по меньшей мере внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и цитоплазматический сигнальный домен (также называемый в данном описании «внутриклеточным сигнальным доменом»), включающий функциональный сигнальный домен, происходящий от стимулирующей молекулы, определенной ниже. В некоторых воплощениях домены в полипептидной конструкции CAR находятся в одной и той же полипептидной цепи, например, включают химерный слитый белок. В некоторых воплощениях домены в полипептидной конструкции CAR не сопряжены с другими, например, находятся в различных полипептидных цепях, например, как предоставлены в RCAR, описанной ниже.

В одном аспекте стимулирующая молекула CAR представляет собой дзета-цепь, связанную с комплексом Т-клеточных рецепторов. В одном аспекте цитоплазматический сигнальный домен включает первичный сигнальный домен (например, первичный сигнальный домен CD3-дзета). В одном аспекте цитоплазматический сигнальный домен дополнительно включает один или несколько функциональных сигнальных доменов, образованных от по меньшей мере одной костимулирующей молекулы, определенной ниже. В одном аспекте костимулирующую молекулу выбирают из 4 1BB (т.е., CD137), CD27, ICOS и/или CD28. В одном аспекте CAR включает химерный слитый белок, включающий внеклеточный узнающий антиген домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, включающий функциональный сигнальный домен, происходящий от стимулирующей молекулы. В одном аспекте CAR включает химерный слитый белок, включающий внеклеточный узнающий антиген домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, включающий функциональный сигнальный домен, происходящий от костимулирующей молекулы, и функциональный сигнальный домен, происходящий от стимулирующей молекулы. В одном аспекте CAR включает химерный слитый белок, включающий внеклеточный узнающий антиген домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, включающий функциональные сигнальные домены, происходящие от одной или нескольких костимулирующих молекул, и функциональный сигнальный домен, происходящий от стимулирующей молекулы. В одном аспекте CAR включает химерный слитый белок, включающий внеклеточный узнающий антиген домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, включающий по меньшей мере два функциональных сигнальных домена, происходящих от одной или нескольких костимулирующих молекул, и функциональный сигнальный домен, происходящий от стимулирующей молекулы. В одном аспекте CAR включает необязательную лидерную последовательность по аминоконцу (N-ter) слитого белка CAR. В одном аспекте CAR включает дополнительно лидерную последовательность по N-концу внеклеточного узнающего антиген домена, причем лидерная последовательность необязательно отщепляется от узнающего антиген домена (например, ак scFv) во время клеточного процессинга и локализации CAR на клеточной мембране.

CAR, который включает антигенсвязывающий домен (например, scFv), однодоменное

антитело или TCR (например, домен, связывающий TCR-альфа, или домен, связывающий TCR-бета), который специфически связывает специфический опухолевый маркер X, где X может представлять собой опухолевый маркер, описанный в настоящем описании, также называют XCAR. Например, CAR, который включает антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CLL-1, называют CLL-1-CAR. CAR может экспрессироваться в любой клетке, например, иммунной эффекторной клетке, как описано в настоящем описании (например, Т-клетке или NK-клетке).

Термин «сигнальный домен» относится к функциональной части белка, которая действует путем передачи информации в клетке для регулирования клеточной активности через определенные пути передачи сигнала путем генерации вторичных мессенджеров или функционируя как эффекторы, реагируя на такие мессенджеры.

Используемый в настоящем описании термин «CLL-1» относится к лектиноподобной молекуле 1 С-типа, которая является антигенной детерминантной, обнаруживаемой в предшественниках лейкозных клеток и в здоровых иммунных клетках. Лектиноподобная молекула 1 С-типа (CLL-1) также известна как MICL, CLEC12A, CLEC-1, лектин 1, ассоциированный с дендритными клетками, и DCAL-2. Человеческие и мышиные аминокислотные и нуклеотидные последовательности можно найти в общедоступной базе данных, такой как GenBank, UniProt и Swiss-Prot. Например, аминокислотную последовательность человеческого CLL-1 можно найти в UniProt/Swiss-Prot, инвентарный № Q5QGZ9, и нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий CLL-1, можно найти под инвентарными №№ NM 001207010.1, NM 138337.5, NM 201623.3 и NM 201625.1. В одном воплощении антигенсвязывающая часть CAR узнает и связывает эпитоп во внеклеточном домене белка CLL-1 или его фрагменте. В одном воплощении белок CLL-1 экспрессируется в раковой клетке.

Термин «антитело», используемый в настоящем описании, относится к белку или полипептидной последовательности, происходящей от молекулы иммуноглобулина, который специфически связывается с антигеном. Антитела могут быть поликлональными или моноклональными, многоцепочечными и одноцепочечными или интактными иммуноглобулинами и могут быть образованы от природных источников или от рекомбинантных источников. Антитела могут представлять собой тетрамеры молекул иммуноглобулинов.

Термин «фрагмент антитела», используемый в настоящем описании, относится к по меньшей мере одной части интактного антитела или его рекомбинантных вариантов и относится к антигенсвязывающему домену, например, вариативному участку, определяющему антигенность интактного антитела, которая является достаточной для придания способности к узнаванию и специфического связывания фрагмента антитела с мишенью, такой как антиген. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются перечисленным фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, фрагменты антитела scFv, линейные антитела, камелидные VHH домены и полиспецифические молекулы, образованные из фрагментов антител, таких как двухвалентный фрагмент, включающий два или больше, например, два, Fab-фрагментов, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирном участке, или два или больше, например, два, изолированных CDR или других соединенных эпитопсвязывающих фрагментов антитела. Фрагменты антител также могут быть включены в одноцепочечные доменные антитела, макситела, минитела, нанотела, интратела, диатела, триатела, тетратела, v-NAR и бис-scFv (см., например, Hollinger и Hudson, Nature Biotechnology, 23: 1126-1136, 2005). Фрагменты антител также могут быть привиты на каркасы на основе полипептидов, такие как фибронектин типа III (Fn3) (см. патент США № 6703199, в котором описываются фибронектиновые

полипептидные минителя).

Термин «scFv» относится к слитому белку, включающему по меньшей мере один фрагмент антитела, включающий вариабельный участок легкой цепи, и по меньшей мере один фрагмент антитела, включающий вариабельный участок тяжелой цепи, причем вариабельные участки легкой и тяжелой цепи тесно связаны через короткий жесткий пептидный линкер, и способный экспрессироваться как одноцепочечный полипептид, и при этом scFv сохраняет специфичность интактного антитела, от которого он образован. Если не определено точно, при использовании в настоящем описании scFv может иметь вариабельные участки VL и VH в любом порядке, например, относительно Т- и С-концов полипептида, scFv может включать VL-линкер-VH или VH-линкер-VL.

Термин «участок, определяющий комплементарность» или «CDR», используемый в настоящем описании, относится к последовательностям аминокислот в вариабельных участках антитела, которые придают антигенспецифичность и аффинность связывания. Например, вообще имеются три CDR в каждом вариабельном участке тяжелой цепи (например, HCCDR1, HCCDR2 и HCCDR3) и три CDR в каждом вариабельном участке легкой цепи (например, LCCDR1, LCCDR2 и LCCDR3). Точные границы аминокислотных последовательностей данного CDR можно определить с использованием любой из ряда хорошо известных схем, включая схемы, описанные Kabat et al. (1991), «Sequences of Proteins of Immunological Interest», 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (схема нумерации «Кабат»), Al-Lazikani et al., (1997), JMB 273, 927-948 (схема нумерации «Чотиа»), или их комбинации. По схеме нумерации по Кабату в некоторых воплощениях аминокислотные остатки CDR в вариабельном домене тяжелой цепи (VH) нумеруются 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); и аминокислотные остатки CDR в вариабельном домене легкой цепи (VL) нумеруются 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2), и 89-97 (LCDR3). По схеме нумерации по Чотиа в некоторых воплощениях аминокислоты CDR в VH нумеруются 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); и аминокислотные остатки CDR в VL нумеруются 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) и 91-96 (LCDR3). В комбинированной схеме нумерации по Кабату и Чотиа в некоторых воплощениях CDR соответствуют аминокислотным остаткам, которые являются частью CDR по Кабату, CDR по Чотиа или по той и другой схеме. Например, в некоторых воплощениях CDR соответствуют аминокислотным остаткам 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3) в VH, например, VH млекопитающего, например, VH человека; и аминокислотным остаткам 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) в VL, например, VL млекопитающего, например, VL человека.

Часть композиции CAR по изобретению, включающая антитело или фрагмент антитела, может существовать в различных формах, например, в которых антигенсвязывающий домен экспрессируется как часть полипептидной цепи, включая, например, фрагмент однодоменного антитела (sdAB), одноцепочечное антитело (scFv), например, человеческого антитела (Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426). В одном аспекте антигенсвязывающий домен композиции CAR по изобретению включает фрагмент антитела. В другом аспекте CAR включает фрагмент антитела, который включает scFv.

Термин «связывающий домен», используемый в настоящем описании, или «молекула антитела» (также называемая в настоящем описании «анти-мишень (например, CLL-1)

связывающий фрагмент») относится к белку, например, цепи иммуноглобулина или ее фрагменту, включающим по меньшей мере одну последовательность вариабельного домена иммуноглобулина. Термин «связывающий домен» или «молекула антитела» охватывает антитела и фрагменты антител. В одном воплощении молекула антитела представляет собой молекулу полиспецифического антитела, например, она включает несколько последовательностей вариабельного домена иммуноглобулина, причем первая последовательность вариабельного домена иммуноглобулина из нескольких имеет специфичность связывания в отношении первого эпитопа, и вторая последовательность вариабельного домена иммуноглобулина из нескольких имеет специфичность связывания в отношении второго эпитопа. В одном воплощении молекула полиспецифического антитела представляет собой молекулу биспецифического антитела. Биспецифическое антитело имеет специфичность в отношении не более двух антигенов. Молекула биспецифического антитела характеризуется первой последовательностью вариабельного домена иммуноглобулина, которая имеет специфичность связывания в отношении первого эпитопа, и второй последовательностью вариабельного домена иммуноглобулина, которая имеет специфичность связывания в отношении второго эпитопа.

Термин «тяжелая цепь антитела» относится к более крупной из двух типов полипептидных цепей, присутствующих в молекулах антител в их встречающихся в природе конформациях, и которая обычно определяет класс, к которому принадлежит антитело.

Термин «легкая цепь антитела» относится к меньшей цепи из двух типов полипептидных цепей, присутствующих в молекулах антител в их встречающихся в природе конформациях. Легкие цепи каппа (κ) и лямбда (λ) относятся к двум основным изотипам легкой цепи антитела.

Термин «рекомбинантное антитело» относится к антителу, которое получают с использованием технологии рекомбинантных ДНК, такие как, например, антитело, экспрессируемое экспрессирующей системой бактериофагов или дрожжей. Термин также следует истолковывать как обозначающий антитело, которое получено синтезом молекулы ДНК, кодирующей антитело, и молекула такой ДНК экспрессирует белок антитело или аминокислотную последовательность, определяющую антитело, где ДНК или аминокислотную последовательность получают с использованием технологии рекомбинантных ДНК или аминокислотных последовательностей, которые доступны и хорошо известны в технике.

Термин «антиген» или «Ag» относится к молекуле, которая вызывает иммунную реакцию. Иммунная реакция может включать или продуцирование антител или активацию специфических иммунокомпетентных клеток или то и другое. Специалистам в данной области техники будет понятно, что любая макромолекула, включая фактически все белки или пептиды, может служить в качестве антигена. Более того, антигены могут быть образованы из рекомбинантной или геномной ДНК. Специалистам в данной области техники будет понятно, что любая ДНК, которая включает нуклеотидные последовательности или неполную нуклеотидную последовательность, кодирующие белок, который вызывает иммунную реакцию на них, кодирует «антиген», как этот термин используется в настоящем описании. Кроме того, специалистам в данной области техники будет понятно, что антиген необязательно кодируется только полноразмерной нуклеотидной последовательностью гена. Достаточно очевидно, что настоящее изобретение включает, но не ограничивается перечисленным, применение неполных нуклеотидных последовательностей более одного гена, и что такие

нуклеотидные последовательности выстраиваются в различных комбинациях для кодирования полипептидов, которые выявляют нужную иммунную реакцию. Более того, специалистам в данной области техники будет понятно, что антиген совсем необязательно кодируется «геном». Достаточно очевидно, что антиген можно получить синтетически или можно получить из биологического образца, или он может представлять собой макромолекулу помимо полипептида. Такой биологический образец может включать, но не ограничиваться перечисленным, образец ткани, образец опухоли, клетки или жидкость с другими биологическими компонентами.

Термин «противоопухолевое действие» относится к биологическому действию, которое может проявиться различными путями, включая, но не ограничиваясь перечисленным, например, снижение объема опухоли, снижение числа опухолевых клеток, снижение числа метастазов, увеличение вероятной продолжительности жизни, снижение пролиферации опухолевых клеток, снижение выживания опухолевых клеток или облегчение различных физиологических симптомов, связанных с раковым состоянием. «Противоопухолевое действие» также может проявиться способностью пептидов, полинуклеотидов, клеток и антител по изобретению предупреждать появление опухоли в первую очередь.

Термин «аутологичный» относится к любому материалу, полученному от одного и того же индивидуума, которому позднее его вводят.

Термин «аллогенный» относится к любому материалу, полученному от другого животного того же вида, что и индивидуум, которому материал вводят. Двух или больше индивидуумов называют аллогенными друг другу, когда гены в одном или нескольких локусах не являются идентичными. В некоторых аспектах аллогенный материал от индивидуумов одного и того же вида может в значительной степени не подходить для антигенного взаимодействия.

Термин «ксеногенный» относится к трансплантату, полученному от животного другого вида.

Термин «аферез», используемый в настоящем описании, относится к признанному в данной области техники экстракорпоральному способу, с помощью которого кровь донора или пациента берут у донора или пациента и пропускают через аппарат, который отделяет выбранную(ые) определенную(ые) составляющую(ие) крови и возвращает остальное в кровоток донора или пациента, например, ретрансфузией. Таким образом, в контексте «аферезный образец» относится к образцу, полученному с использованием афереза.

Тераин «комбинация» относится или к фиксированной комбинации в одной лекарственной форме или к комбинированному введению, когда соединение по настоящему изобретению и партнера по комбинации (например, другое лекарственное средство, как поясняется ниже, также называемое «терапевтическим средством» или «соагентом») могут вводиться независимо в одно и то же время или отдельно с временными интервалами, в особенности, когда такие временные интервалы учитывают, что партнеры по комбинации показывают совместное, например, синергитическое действие. Отдельные компоненты могут упаковываться в наборе или по отдельности. Один или оба компонента (например, порошки или жидкости) могут восстанавливаться или разбавляться до нужной дозы перед введением. Термины «совместное введение» или подобные, используемые в настоящем описании, предназначены для включения введения выбранного партнера по комбинации отдельному субъекту, нуждающемуся в этом (например, пациенту), и предназначены для включения схем приема лекарственных средств, в которых средства необязательно вводятся одинаковым путем

введения или в одно и то же время. Термин «фармацевтическая композиция», используемый в настоящем описании, обозначает продукт, который является результатом смешивания или объединения более одного активного ингредиента, и включает как фиксированные, так и нефиксированные комбинации активных ингредиентов. Термин «фиксированная комбинация» означает, что активные ингредиенты, например, соединение по настоящему изобретению и партнер по комбинации оба вводятся пациенту одновременно в форме единой сущности или лекарственной формы. Термин «нефиксированная комбинация» означает, что активные ингредиенты, например, соединение по настоящему изобретению и партнер по комбинации оба вводятся пациенту в виде отдельных сущностей одновременно, совместно или последовательно без определенного предела по времени, причем такое введение обеспечивает терапевтически эффективные уровни двух соединений в организме пациента. Последнее также применимо для коктейльной терапии, например, введения трех или больше активных ингредиентов.

Термин «рак» относится к заболеванию, характеризующемуся быстрым и неуправляемым ростом аберрантных клеток. Раковые клетки могут распределяться локально или через кровоток и лимфатическую систему в другие части организма. Примеры различных раковых заболеваний описаны в настоящем описании и включают, но не ограничиваются перечисленным, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичников, цервикальный рак, рак кожи, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак почек, рак печени, рак головного мозга, лимфому, лейкоз, рак легких и т.п.. Термины «опухоль» и «рак» в настоящем описании используются взаимозаменяемо, например, оба термина охватывают солидные и жидкие, например, диффузные или переносимые кровотоком опухоли. Используемые в настоящем описании термины «рак» или «опухоль» включают предзлокачественные, а также злокачественные раки и опухоли.

«Полученная из», как этот термин используется в настоящем описании, показывает соотношение между первой и второй молекулой. Как правило, термин относится к структурному сходству между первой и второй молекулой и не означает или не включает ограничение способа или источника первой молекулы, которую получают из второй молекулы. Например, в случае внутриклеточного сигнального домена, который получают из молекулы CD3-дзета, внутриклеточный сигнальный домен сохраняет достаточную структуру CD3-дзета, так что имеет требуемую функцию, а именно, способность генерировать сигнал в соответствующих условиях. Он не означает или не включает ограничение по определенному способу получения внутриклеточного сигнального домена, например, не означает, что для предоставления внутриклеточного сигнального домена необходимо исходить из последовательности CD3-дзета и deletировать нежелательную последовательность, или улучшить мутации для того, чтобы получить внутриклеточный сигнальный домен.

Выражение «заболевание, связанное с экспрессией CLL-1» включает, но не ограничивается перечисленным, заболевание, связанное с клеткой, которая экспрессирует CLL-1, или состояние, связанное с клеткой, которая экспрессирует CLL-1, включая, например, пролиферативные заболевания, такие как рак или злокачественность, или предраковое состояние, такое как миелодисплазия, миелодиспластический синдром или предлейкоз; или неродственное раку показание, связанное с клеткой, которая экспрессирует CLL-1 (например, CLL-1 дикого типа или мутантный). Во избежание сомнений заболевание, связанное с экспрессией CLL-1, может включать состояние, связанное с клеткой, которая в настоящее время не экспрессирует

CLL-1, например, поскольку экспрессия CLL-1 регулируется отрицательно, например, из-за лечения молекулой, таргетной для CLL-1, например, ингибитором CLL-1, описанным в настоящем описании, но которая какое-то время экспрессировала CLL-1. В одном аспекте рак, связанный с экспрессией CLL-1, представляет собой рак кроветворной системы. В одном аспекте рак кроветворной системы включает, но не ограничивается перечисленным, лейкоз (такой как острый миелогенный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, острый лимфоидный лейкоз, хронический лимфоидный лейкоз и миелодиспластический синдром) и злокачественные лимфопролиферативные состояния, включая лимфому (такую как множественная лимфома, неходжкинская лимфома, лимфома Беркетта и мелкоклеточная и крупноклеточная фолликулярная лимфома). Другие заболевания, связанные с экспрессией CLL-1, включают, но не ограничиваются перечисленным, например, атипичные и/или неклассические раковые заболевания, злокачественности, предраковые состояния или пролиферативные заболевания, связанные с экспрессией CLL-1. Также могут быть включены неродственные раку показания, связанные с экспрессией CLL-1. В некоторых воплощениях опухолевые антигенэкспрессирующие клетки экспрессируют, или в любое время экспрессируют, мРНК, кодирующую опухолевый антиген. В одном воплощении опухолевая антигенэкспрессирующая клетка продуцирует белок опухолевый антиген (например, дикого типа или мутантный), и опухолевый белок антиген может присутствовать на нормальных уровнях или пониженных уровнях. В одном воплощении опухолевая антигенэкспрессирующая клетка продуцирует детектируемые уровни опухолевого белка антигена в один момент и затем продуцирует по существу недетектируемые уровни опухолевого белка антигена.

Термины «консервативные модификации последовательности» или «консервативные замены» относятся к модификациям аминокислот, которые существенно не влияют или не изменяют связывающие характеристики антитела или фрагмента антитела, содержащих аминокислотную последовательность. Такие консервативные модификации включают замены, присоединения и делеции. Модификации можно ввести в антитело или фрагмент антитела по изобретению стандартными способами, известными в технике, такими как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативные замены представляют собой замены, при которых аминокислотный остаток заменяют аминокислотным остатком, имеющим схожую боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих схожие боковые цепи, определены в технике. Такие семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, один или больше аминокислотных остатков в CAR по изобретению можно заменить другими аминокислотными остатками из семейства с такими же боковыми цепями, и измененный CDR можно проверить с использованием функциональных анализов, описанных в настоящем описании.

Термин «стимуляция» относится к первичной реакции, вызванной связыванием стимулирующей молекулы (например, комплекса TCR/CD3) с ее родственным лигандом, посредством чего опосредуется событие сигнальной трансдукции, такое как, но без

ограничения, сигнальная трансдукция через комплекс TCR/CD3. Стимуляция может опосредовать измененную экспрессию некоторых молекул, такую как отрицательная регуляция TGF- β , и/или реорганизация цитоскелетных структур, и т.п..

5 Термин «стимулирующая молекула» относится к молекуле, экспрессированной Т-клеткой, которая обеспечивает первичную(ые) цитоплазматическую(ие) сигнальную (ые) последовательность(и), которая(ые) регулирует(ют) первичную активацию комплекса TCR путем стимуляции в отношении по меньшей мере некоторого аспекта пути передачи сигнала Т-клетками. В одном аспекте первичный сигнал инициируют, например, путем связывания комплекса TCR/CD3 с молекулой ГКГС, нагруженной
10 пептидом, и которое ведет к опосредованию Т-клеточной реакции, включая, но не ограничиваясь перечисленным, пролиферацию, активацию, дифференцировку и т.п. Первичная цитоплазматическая сигнальная последовательность (также называемая «первичным сигнальным доменом»), которая действует путем стимуляции, может содержать сигнальный мотив, который известен как иммунорецепторный мотив активации на основе тирозина или ITAM. Примеры ITAM-содержащей первичной цитоплазматической сигнальной последовательности, которая является отдельным применением в изобретении, включают, но не ограничиваются перечисленным, последовательности TCR-дзета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (также известную как "ICOS"), Fc ϵ RI, CD66d,
20 DAP10 и DAP12. В специфическом CAR по изобретению внутриклеточный сигнальный домен в любом одном или нескольких CARS по изобретению включает внутриклеточную сигнальную последовательность, например, первичную сигнальную последовательность CD3-дзета. В специфическом CAR по изобретению первичная сигнальная последовательность CD3-дзета представляет собой последовательность, представленную как SEQ ID NO: 9, или эквивалентные остатки от видов, не являющихся человеком,
25 например, мыши, грызуна, обезьяны и т.п. В специфическом CAR по изобретению первичная сигнальная последовательность CD3-дзета представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, или эквивалентные остатки от видов, не являющихся человеком, например, мыши, грызуна, обезьяны и т.п.

30 Термин «антигенпрезентирующая клетка» или «APC» относится к клетке иммунной системы, такой как аксессуарная клетка (например, В-клетка, дендритная клетка и т.п.), которая отображает чужеродный антиген в комплексе с главными комплексами гистосовместимости (ГКГС) на своей поверхности. Т-Клетки могут узнавать такие комплексы с использованием своих Т-клеточных рецепторов (TCR). APC процессируют
35 антигены и представляют их Т-клеткам.

«Внутриклеточный сигнальный домен» как термин, используемый в настоящем описании, относится к внутриклеточной части молекулы. Внутриклеточный сигнальный домен генерирует сигнал, который промотирует иммунную эффекторную функцию CAR-содержащей клетки, например, CART клетки. Примеры иммунной эффекторной
40 функции, например, в CART клетке, включают цитолитическую активность и хелперную активность, включая секрецию цитокинов. В воплощениях внутриклеточный сигнальный домен трансдуцирует сигнал эффекторной функции и направляет клетку на выполнение определенной функции. Хотя может быть использован весь внутриклеточный сигнальный домен, во многих случаях нет необходимости использовать полную цепь.
45 До степени, до которой используют отсеченную часть внутриклеточного сигнального домена, такую отсеченную часть можно использовать вместо интактной цепи до тех пор, пока она трансдуцирует сигнал эффекторной функции. Таким образом, термин «внутриклеточный сигнальный домен» означает включение любой отсеченной части

внутриклеточного сигнального домена, достаточной для трансдукции сигнала эффекторной функции.

В одном воплощении внутриклеточный сигнальный домен может включать первичный внутриклеточный сигнальный домен. Примеры первичных внутриклеточных сигнальных доменов включают домены, полученные из молекул, ответственных за первичную стимуляцию или антигензависимую стимуляцию. В одном воплощении внутриклеточный сигнальный домен может включать костимулирующий внутриклеточный домен. Примеры костимулирующих внутриклеточных сигнальных доменов включают домены, полученные из молекул, ответственных за костимулирующие сигналы или антигеннезависимую стимуляцию. Например, в случае CART первичный внутриклеточный сигнальный домен может включать цитоплазматическую последовательность Т-клеточного рецептора, и костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен может включать цитоплазматическую последовательность из корцептора или костимулирующей молекулы.

Первичный внутриклеточный сигнальный домен может включать сигнальный мотив, который известен как иммунорецепторный активирующий мотив на основе тирозина или ITAM. Примеры ITAM-содержащих первичных цитоплазматических сигнальных последовательностей включают, но не ограничиваются перечисленным, последовательности, полученные из CD3-дзета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (также известного как «ICOS»), FcεRI, CD66d, DAP10 и DAP12.

Термин «дзета» или альтернативно «дзета-цепь», «CD3-дзета» или «TCR-дзета» определяется как белок, предоставленный GenBank, инв. № BAG36664.1, или эквивалентные остатки от видов, не являющихся человеком, например, мыши, грызуна, обезьяны и т.п., и «дзета стимулирующий домен» или альтернативно «CD3-дзета стимулирующий домен» или «TCR-дзета стимулирующий домен» определяется как аминокислотные остатки из цитоплазматического домена дзета-цепи, которые являются достаточными для функциональной передачи начального сигнала, необходимого для активации Т-клеток. В одном аспекте цитоплазматический домен дзета включает остатки с 52 по 164 из GenBank, инв. № BAG36664.1, или эквивалентные остатки от видов, не являющихся человеком, например, мыши, грызуна, обезьяны и т.п., которые являются их функциональными ортологами. В одном аспекте «дзета стимулирующий домен» представляет собой последовательность, представленную как SEQ ID NO: 9. В одном аспекте «дзета стимулирующий домен» или «CD3-дзета стимулирующий домен» представляет собой последовательность, представленную как SEQ ID NO: 10.

Термин «костимулирующая молекула» относится к близкому партнеру по связыванию на Т-клетке, который специфически связывается с костимулирующим лигандом, посредством чего опосредуется костимулирующая реакция с помощью Т-клетки, такая как, но без ограничения, пролиферация. Костимулирующие молекулы представляют собой молекулы клеточной поверхности иные, чем антигенные рецепторы или их лиганды, которые требуются для эффективной иммунной реакции. Костимулирующие молекулы включают, но не ограничиваются перечисленным, молекулу класса I ГКГС, белки рецептора TNF, иммуноглобулиноподобные белки, цитокиновые рецепторы, интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM), активирующие рецепторы NK-клеток, BTLA, лиганд Толл-рецептора, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R-

альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (тактильный), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229),
 5 CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a и лиганд, который специфически связывается с CD83.

Костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен относится к внутриклеточной части костимулирующей молекулы.

10 Внутриклеточный сигнальный домен может включать всю внутриклеточную часть или весь нативный внутриклеточный сигнальный домен молекулы, из которой его получают, или его функциональный фрагмент.

Термин «4-1BB» относится к члену суперсемейства TNFR с аминокислотной последовательностью, представленной в GenBank, инв. № AAA62478.2, или
 15 эквивалентными остатками от видов, не являющихся человеком, например, мыши, грызуна, обезьяны и т.п.; и «4-1BB костимулирующий домен» определяется как аминокислотные остатки GenBank, инв. № AAA62478.2, или эквивалентные остатки от видов, не являющихся человеком, например, мыши, грызуна, обезьяны и т.п.. В одном аспекте «4-1BB костимулирующий домен» представляет собой последовательность,
 20 представленную как SEQ ID NO: 7, или эквивалентные остатки от видов, не являющихся человеком, например, мыши, грызуна, обезьяны и т.п..

«Иммунная эффекторная клетка» как термин, используемый в настоящем описании, относится к клетке, которая вовлечена в иммунную реакцию, например, в промотирование иммунной эффекторной реакции. Примеры иммунных эффекторных
 25 клеток включают Т-клетки, например, альфа/бета Т-клетки и гамма/дельта Т-клетки, В-клетки, природные киллерные (NK) клетки (NKT), тучные клетки и фагоциты миелоидного происхождения.

«Иммунная эффекторная функция или иммунная эффекторная реакция» как термин, используемый в настоящем описании, относится к функции или реакции, например,
 30 иммунной эффекторной клетки, которая усиливает или промотирует иммунную атаку клетки-мишени. Например, иммунная эффекторная функция или реакция относится к свойству Т- или NK-клетки промотировать киллинг или ингибирование роста или пролиферации клетки-мишени. В случае Т-клетки примерами эффекторной функции или реакции являются первичная стимуляция и костимуляция.

35 Термин «эффекторная функция» относится к определенной функции клетки. Эффекторной функцией Т-клетки, например, может являться цитолитическая активность или хелперная активность, включая секрецию цитокинов.

Термин «кодирование» относится к неотъемлемому свойству специфической последовательности нуклеотидов в полинуклеотиде, таком как ген, кДНК или мРНК,
 40 для служения в качестве матриц для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах, имеющих или определенную последовательность нуклеотидов (например, рРНК, тРНК и мРНК) или определенную последовательность аминокислот и биологические свойства, проистекающие из этого. Таким образом, ген, кДНК или РНК кодирует белок, если транскрипция и трансляция мРНК, соответствующей такому
 45 гену, продуцирует белок в клетке или другой биологической системе. Как кодирующая цепь, нуклеотидная последовательность которой идентична последовательности мРНК и обычно предоставляется в списках последовательностей, так и не кодирующая цепь, используемые в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, могут называться

кодирующими белок или другой продукт такого гена или кДНК.

Если не оговорено иное, «нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность» включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными вариантами друг друга, и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Выражение «нуклеотидная последовательность, которая кодирует белок или РНК, также может включать интроны» означает, что нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, может в каком-то варианте содержать интрон(ы).

Термины «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» используются в настоящем описании как взаимозаменяемые и относятся к количеству соединения, препарата, материала или композиции, описанных в настоящем описании, эффективному для достижения определенного биологического результата.

Термин «эндогенный» относится к любому материалу от или полученному в организме, клетке, ткани или системе.

Термин «экзогенный» относится к любому материалу от или полученному вне организма, клетки, ткани или системы.

Термин «экспрессия» относится к транскрипции и/или трансляции определенной нуклеотидной последовательности, полученной с помощью промотора.

Термин «трансферный вектор» относится к композиции вещества, которая включает изолированную нуклеиновую кислоту, и которую можно использовать для доставки нуклеиновой кислоты в клетку. В технике известно много векторов, включая, но не ограничиваясь перечисленным, линейные полинуклеотиды, полинуклеотиды, связанные с ионногенными или амфифильными соединениями, плазмиды и вирусы. Таким образом, термин «трансферный вектор» включает автономно реплицирующиеся плазмиду или вирус. Термин также следует истолковывать как включающий дополнительно неплазмидные и невирусные соединения, которые облегчают перенос нуклеиновой кислоты в клетки, такие как, например, полилизиновое производное, липосома и т.п. Примеры вирусных трансферных векторов включают, но не ограничиваются перечисленным, аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы и т.п.

Термин «экспрессирующий вектор» относится к вектору, включающему рекомбинантный полинуклеотид, включающий экспрессирующие регулярные последовательности, оперативно соединенные с экспрессируемой нуклеотидной последовательностью. Экспрессирующий вектор включает достаточные cis-действующие элементы для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут быть предоставлены клеткой-реципиентом или в *in vitro* экспрессирующей системе. Экспрессирующие векторы включают все векторы, известные в технике, включая космиды, плазмиды (например, открытые или содержащиеся в липосомах) и вирусы (например, лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые включают рекомбинантный полинуклеотид.

Термин «лентивирус» относится к роду семейства *Retroviridae*. Лентивирусы уникальны среди ретровирусов по способности инфицировать неделящиеся клетки; они могут доставлять значительное количество генетической информации в ДНК клетки-реципиента, так что они являются одним из наиболее эффективных способов доставки вектора в ген. Примерами лентивирусов являются HIV, SIV и FIV.

Термин «лентивирусный вектор» относится к вектору, полученному из по меньшей мере части лентивирусного генома, включая в особенности самоинактивирующийся лентивирусный вектор, описанный в Milone et al., *Mol. Ther.*, 17(8): 1453-1464 (2009).

Другие примеры лентивирусных векторов, которые можно использовать в клинических условиях, включают, но не ограничиваются перечисленным. например, технологию доставки генов LENTIVECTOR® от Oxford BioMedica, векторную систему LENTIMAX™ от Lentigen и т.п.. Неклинические типы векторов также доступны и должны быть

известны специалистам в данной области техники.

Термин «гомологичность» или «идентичность» относится к идентичности субъединиц последовательности двух полимерных молекул, например, двух молекул нуклеиновых кислот или двух молекул РНК или двух полипептидных молекул. Когда позиция субъединицы в обеих из двух молекул занята одной и той же мономерной единицей, например, если позиция в каждой из двух молекул ДНК занята аденином, тогда они являются гомологичными или идентичными в этой позиции. Гомология между двумя последовательностями является прямой функцией числа совпадений или гомологичных позиций; например, если половина (например, пять позиций в полимере длиной в десять субъединиц) позиций в двух последовательностях являются гомологичными, две последовательности являются гомологичными на 50%; если 90% позиций (например, 9 из 10) совпадают или являются гомологичными, две последовательности являются гомологичными на 90%.

«Гуманизированные» формы не являющихся человеческими (например, мышинных) антител представляют собой химерные иммуноглобулины, иммуноглобулиновые цепи или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, или другие антигенсвязывающие последовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. По большей части, гуманизированные антитела и фрагменты таких антител представляют собой человеческие иммуноглобулины (реципиентное антитело или фрагмент антитела), в которых остатки из определяющего комплементарность участка (CDR) реципиента заменяются остатками из CDR вида, не относящегося к человеку, такого как мышь, крыса или кролик, имеющего желательную специфичность, аффинность и потенциал. В некоторых случаях остатки каркасного участка Fv (FR) человеческого иммуноглобулина заменяют соответствующими остатками, не являющимися человеческими. Более того, гуманизированное антитело/фрагмент антитела может включать остатки, которые не обнаруживаются ни в антителе реципиента, ни в введенном CDR или каркасных последовательностях. Такие модификации могут дополнительно улучшать и оптимизировать действия антитела или фрагмента антитела. Вообще гуманизированное антитело или фрагмент такого антитела будет включать по существу все из по меньшей мере одного и типично двух переменных доменов, в которых все или по существу все участки CDR соответствуют участкам нечеловеческого иммуноглобулина, и все или значительная часть участков FR представляют собой участки последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело или фрагмент такого антитела также может включать по меньшей мере часть константного участка (Fc) иммуноглобулина, типично участка иммуноглобулина человека. Другие подробности см. в Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332: 323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596, 1992.

«Полностью человеческий» относится к иммуноглобулину, такому как антитело или фрагмент антитела, где вся молекула человеческого происхождения или состоит из аминокислотной последовательности, идентичной человеческой форме антитела или иммуноглобулина.

Термин «изолированный» означает измененный или извлеченный из природного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, присутствующие по природе

в живом организме, не являются «изолированными», но те же нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отдельные от материалов, с которыми совместно существуют в своем природном состоянии, являются «изолированными».

Изолированные нуклеиновая кислота или белок могут существовать по существу в чистой форме или могут существовать в ненативной окружающей среде, такой как, например, клетка-реципиент.

В контексте настоящего изобретения используются приведенные далее аббревиатуры для обычно используемых нуклеотидных оснований. «А» относится к аденозину, «С» относится к цитозину, «G» относится к гуанозину, «Т» относится к тимидину и «U» относится к уридину.

Термин «операбельно соединенный» или «транскрипционный контроль» относится к функциональной связи между регуляторной последовательностью и гетерологичной нуклеотидной последовательностью, полученной при экспрессии последней. Например, первая нуклеотидная последовательность операбельно соединена со второй

нуклеотидной последовательностью, когда первая нуклеотидная последовательность заменяется в функциональном соотношении второй нуклеотидной последовательностью, если промотор влияет на транскрипцию или экспрессию кодирующей последовательности. Операбельно соединенные ДНК-последовательности могут соприкасаться друг с другом и, например, где необходимо, соединять два кодирующих белок участка, находятся в одной и той же рамке считывания.

Термин «парентеральное» введение иммуногенной композиции включает, например, подкожную (s/c), внутривенную (i.v.) или интратермальную инъекцию, внутриопухолевые или инфузионные методы.

Термин «нуклеиновая кислота» или «полинуклеотид» относятся к дезоксирибонуклеиновым кислотам (ДНК) или рибонуклеиновым кислотам (РНК) и их полимерам в одно- или двухцепочечной форме. Если нет конкретных ограничений, термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, которые имеют свойства связывания, схожие с эталонной нуклеиновой кислотой, и метаболизируются подобно нуклеотидам, встречающимся в природе. Если не указано иное, определенная нуклеотидная последовательность также косвенно охватывает ее консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденного кодона), аллели, ортологи, SNP и комплементарные последовательности, а также точно указанную последовательность. Конкретно замен вырожденного кодона можно достигнуть путем генерации последовательностей, в которых третья позиция одного или нескольких (или всех) выбранных кодонов заменена смешанными основными и/или дезоксинозиновыми остатками (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.*, 19: 5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.*, 260: 2605-2608 (1985); и Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes*, 8: 91-98 (1994)).

Термины «пептид», «полипептид» и «белок» используются как взаимозаменяемые и относятся к соединению, состоящему из аминокислотных остатков, ковалентно соединенных пептидными связями. Белок или пептид должен содержать по меньшей мере две аминокислоты, и нет ограничения по числу аминокислот, которые могут составлять белковую или пептидную последовательность. Полипептиды включают любой пептид или белок, включающий две или больше аминокислот, связанных друг с другом пептидными связями. Используемый в настоящем описании термин относится как к коротким цепям, которые обычно в технике называют пептидами, олигопептидами и олигомерами, например, так и к более длинным цепям, которые обычно называют в технике белками, которых существует множество типов. «Полипептиды» включают,

например, среди прочих, биологически активные фрагменты, по существу гомологичные полипептидам, олигопептиды, гомодимеры, гетеродимеры, варианты полипептидов, модифицированные полипептиды, производные, аналоги, слитые белки. Полипептид включает природный пептид, рекомбинантный пептид или их комбинацию.

5 Термин «протомер» относится к ДНК последовательности, узнаваемой синтетическим аппаратом клетки или введенным синтетическим аппаратом, требуемым для инициации специфической транскрипции полинуклеотидной последовательности.

Термин «промотор/регуляторная последовательность» относится к нуклеотидной последовательности, которая требуется для экспрессии генного продукта, операбельно
10 соединенного с промотором/регуляторной последовательностью. В некоторых случаях такая последовательность может представлять собой коровую промоторную последовательность, и в других случаях такая последовательность также может включать энхансерную последовательность и другие регуляторные элементы, которые требуются для экспрессии генного продукта. Промотор/регуляторная
15 последовательность может представлять собой элемент, который экспрессирует генный продукт в ткани специфически.

Термин «конститутивный» промотор относится к нуклеотидной последовательности, которая, когда операбельно связана с полинуклеотидом, который кодирует или точно определяет генный продукт, вызывает продуцирование генного продукта в клетке при
20 большинстве или всех физиологических состояниях клетки.

Термин «индуцируемый промотор» относится к нуклеотидной последовательности, которая, когда операбельно связана с полинуклеотидом, который кодирует или точно определяет генный продукт, вызывает продуцирование генного продукта в клетке по существу только тогда, когда в клетке присутствует индуктор, который соответствует
25 промотору.

Термин «тканеспецифический» промотор относится к нуклеотидной последовательности, которая, когда операбельно связана с полинуклеотидом, который кодирует или точно определяет генный продукт, вызывает продуцирование генного продукта в клетке по существу только если клетка представляет собой клетку ткани
30 типа, соответствующего промотору.

Термин «жесткий полипептидный линкер» или «линкер», используемый в контексте scFv, относится к полипептидному линкеру, который состоит из аминокислот, таких как глицин и/или сериновые остатки, используемых отдельно или в комбинации, для соединения вариабельных участков тяжелой и легкой цепи. В одном воплощении жесткий
35 полипептидный линкер представляет собой линкер Gly/Ser и включает аминокислотную последовательность (Gly-Gly-Gly-Ser)_n (SEQ ID NO: 38), где n равен положительному числу, равному или превышающему 1. Например, n=1, n=2, n=3, n=4, n=5 и n=6, n=7, n=8, n=9 и n=10. В одном воплощении жесткие полипептидные линкеры включают, но не ограничиваются указанным, (Gly₄ Ser)₄ (SEQ ID NO:27) или (Gly₄ Ser)₃ (SEQ ID NO:28).
40 В другом воплощении линкеры включают несколько повторов (Gly₂Ser), (GlySer) или (Gly₃Ser) (SEQ ID NO:29). В объем изобретения также включены линкеры, описанные в WO2012/138475, включенной в настоящее описание в качестве ссылки.

При использовании в настоящем описании 5'-кэп (также называемый РНК-кэп, РНК-7-метилгуанозиновый кэп или РНК m⁷G-кэп) представляет собой модифицированный
45 нуклеотид гуанин, который добавлен к «фронт» или 5'-концу эукариотной матричной РНК вскоре после начала транскрипции. Состоит 5'-кэп из концевой группы, которая соединяется с первым транскрибированным нуклеотидом. Его присутствие критично для узнавания рибосомой и защиты от РНКаз. Добавление кэпа сочетается с

транскрипцией и происходит котранскрипционно, так что одно влияет на другое. Вскоре после начала транскрипции 5'-конец мРНК, будучи синтезированным, связывается с синтезирующим кэп комплексом, связанным с РНК-полимеразой. Такой ферментный комплекс катализирует химические реакции, которые требуются для кэпирования мРНК.

5 Синтез протекает как многостадийная биохимическая реакция. Кэпирующую группу можно модифицировать для модуляции функциональности мРНК, такой как стабильность или эффективность трансляции.

При использовании в настоящем описании «*in vitro* транскрибированная РНК» относится к РНК, предпочтительно, мРНК, которая синтезирована *in vitro*. Как правило, *in vitro* транскрибированную РНК генерируют из транскрипционного вектора *in vitro*. Транскрипционный вектор *in vitro* включает матрицу, которую используют для генерации *in vitro* транскрибированной РНК.

При использовании в настоящем описании «поли(А)» представляет собой ряд аденозинов, присоединенных путем полиаденилирования к мРНК. В предпочтительном воплощении конструкции для временной экспрессии поли-А предпочтительно представляет собой от 50 до 5000 (SEQ ID NO: 30), предпочтительно больше 64, предпочтительнее больше 100, наиболее предпочтительно больше 300 или 400. Последовательности поли(А) можно модифицировать химически или ферментативно для модуляции функциональности мРНК, такой как локализация, стабильность или

20 эффективность трансляции.

При использовании в настоящем описании «полиаденилирование» относится к ковалентной связи полиаденилильной части или ее модифицированного варианта с молекулой матричной РНК. В эукариотных организмах большинство молекул матричной РНК (мРНК) являются полиаденилированными по 3'-концу. Хвост 3'-поли (А) представляет собой длинную последовательность из адениновых нуклеотидов (обычно нескольких сотен), добавленных к пре-мРНК через действие фермента полиаденилатполимеразы. В высших эукариотах хвост поли(А) добавлен к транскриптам, которые содержат специфическую последовательность сигнал полиаденилирования. Хвост поли(А) и белок, связанный с ним, способствуют защите

30 мРНК от разрушения экзонуклеазами. Полиаденилирование также важно для терминации транскрипции, экспорта мРНК из ядра и трансляции. Полиаденилирование происходит в ядре непосредственно после транскрипции ДНК в РНК, но кроме того, также может происходить позднее в цитоплазме. После терминации транскрипции цепь мРНК расщепляется под действием эндонуклеазного комплекса, ассоциированного с РНК-полимеразой. Сайт расщепления обычно характеризуется присутствием

35 последовательности оснований AAUAAA вблизи сайта расщепления. После расщепления мРНК аденозиновые остатки присоединяются к свободному 3'-концу в сайте расщепления.

При использовании в настоящем описании «временная» относится к экспрессии неинтегрированного трансгена в течение часов, дней или недель, где период времени экспрессии меньше, чем период времени экспрессии гена, если интегрирован в геном или содержится в устойчивом плазмидном репликоне в клетке-хозяине.

Используемые в настоящем описании термины «лечить», «лечение» и «лечащий» относятся к ослаблению или уменьшению интенсивности развития, тяжести и/или

45 длительности пролиферативного расстройства или уменьшению интенсивности одного или нескольких симптомов (предпочтительно одного или нескольких видимых симптомов) пролиферативного расстройства, в результате введения одной или нескольких терапий (например, одного или нескольких терапевтических средств, таких

как CAR по изобретению). В определенных воплощениях термины «лечить», «лечение» и «лечащий» относятся к уменьшению интенсивности по меньшей мере одного измеряемого параметра пролиферативного расстройства, такого как рост опухоли, необязательно заметного для пациента. В других воплощениях термины «лечить», «лечение» и «лечащий» относятся к ингибированию развития пролиферативного расстройства физически, например, путем стабилизации видимого симптома, физиологически, например, путем стабилизации физического параметра, или тому и другому. В других воплощениях термины «лечить», «лечение» и «лечащий» относятся к уменьшению или стабилизации размера опухоли или числа раковых клеток.

Термин «путь сигнальной трансдукции» относится к биохимическому соотношению между различными молекулами сигнальной трансдукции, которые играют роль в передаче сигнала от одной части клетки к другой части клетки. Выражение «рецептор клеточной поверхности» включает молекулы и комплексы молекул, способные принимать сигнал и передавать сигнал через мембрану клетки.

Термин «субъект» предназначен для включения живых организмов, в которых может быть вызвана иммунная реакция (например, млекопитающего, человека).

Термин «по существу очищенная» клетка относится к клетке, которая по существу свободна от других типов клеток. По существу очищенной клеткой также называется клетка, которая отделена от других типов клеток, с которыми она обычно связана в своем естественном состоянии. В некоторых случаях популяцией по существу чистых клеток называется гомогенная популяция клеток. В других случаях такой термин относится просто к клетке, которая отделена от клеток, с которыми она обычно связана в своем естественном состоянии. В некоторых аспектах клетки культивируют *in vitro*. В других аспектах клетки не культивируют *in vitro*.

Термин «терапевтический», используемый в настоящем описании, обозначает лечение. Терапевтическое действие получают путем уменьшения, супрессии, ремиссии или устранения болезненного состояния.

Термин «профилактический», используемый в настоящем описании, обозначает предупреждение или протективное лечение болезни или болезненного состояния.

В контексте настоящего изобретения «опухолевый антиген» или «антиген гиперолиферативного расстройства» или «антиген, ассоциированный с гиперолиферативным расстройством» относятся к антигенам, которые обычны для специфических гиперолиферативных расстройств. В некоторых аспектах антигены гиперолиферативного расстройства по настоящему изобретению происходят от раковых заболеваний, включая, но не ограничиваясь перечисленным, первичную или метастазирующую меланому, тимому, лимфому, саркому, рак легких, рак печени, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, лейкоз, рак матки, цервикальный рак, рак мочевого пузыря, рак почек, и аденокарциномы, такие как рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичников, рак поджелудочной железы и т.п..

Термин «трансфицированный» или «трансформированный» или «трансдуцированный» относится к процессу, путем которого экзогенную нуклеиновую кислоту переносят или вводят в клетку-реципиента. «Трансфицированная» или «трансформированная» или «трансдуцированная» клетка представляет собой клетку, которая трансфицирована, трансформирована или трансдуцирована экзогенной нуклеиновой кислотой. Клетка включает первичную клетку субъекта и ее потомство.

Термин «специфически связывает» относится к антителу или лиганду, которые узнают и связываются со сходным партнером по связыванию (например, стимулирующей и/или костимулирующей молекулой, присутствующей в Т-клетке) белком, присутствующем

в образце, но такие антитело или лиганд по существу не узнают или не связываются с другими молекулами в образце.

«Регулирующий химерный антигенный рецептор (RCAR)» при использовании в настоящем описании относится к набору полипептидов, типично двум в самых простых воплощениях, которые, когда находятся в иммунной эффекторной клетке, придают клетке специфичность в отношении клетки-мишени, обычно раковой клетке, и с генерацией регулирующего внутриклеточного сигнала. В некоторых воплощениях RCAR включает по меньшей мере внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный и цитоплазматический сигнальный домен (также называемый в настоящем описании «внутриклеточным сигнальным доменом»), включающий функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы и/или костимулирующей молекулы, определенных в настоящем описании в контексте в связи с молекулой CAR. В некоторых воплощениях полипептиды набора в RCAR не соприкасаются друг с другом, например, находятся в различных полипептидных цепях. В некоторых воплощениях RCAR включает молекулу димеризации, может соединять полипептиды друг с другом, например, может соединять антигенсвязывающий домен с внутриклеточным сигнальным доменом. В некоторых воплощениях RCAR экспрессируется в клетке (например, иммунной эффекторной клетке), описанной в настоящем описании, например, RCAR-экспрессирующей клетке (также называемой в настоящем описании «RCARX-клеткой»). В одном воплощении RCARX-клетка представляет собой Т-клетку и называется RCART-клеткой. В одном воплощении RCARX-клетка представляет собой NK-клетку и называется RCARN-клеткой. RCAR может предоставить RCAR-экспрессирующую клетку со специфичностью к клетке-мишени, обычно опухолевой клетке, и с генерацией регулирующего сигнала или пролиферации, что может оптимизировать иммунное эффекторное свойство RCAR-экспрессирующей клетки. В воплощениях RCAR-клетка опирается, по меньшей мере частично, на антигенсвязывающий домен для обеспечения специфичности к клетке-мишени, которая включает антиген, связываемый антигенсвязывающим доменом.

Термин «мембранный якорь» или «мембрансвязывающий домен», используемый в настоящем описании, относится к полипептиду или группе, например, миристоильной группе, достаточным для закрепления внеклеточного или внутриклеточного домена в плазматической мембране.

Термин «переключающий домен», используемый в настоящем описании, например, в связи с RCAR, относится к элементу, типично элементу на основе полипептида, который в присутствии димеризующей молекулы ассоциируется с другим переключающим доменом. Результатом ассоциации является функциональное сочетание первого элемента, соединенного с, например, слитого с, первым переключающим доменом, и второго элемента, соединенного с, например, слитого с, вторым переключающим доменом. Первый и второй переключающие домены вместе называются переключателем гомодимеризации. В воплощениях первый и второй переключающие домены являются одинаковыми, например, они представляют собой полипептиды, имеющие одинаковую первичную последовательность, и вместе называются переключателем гомодимеризации. В воплощениях первый и второй переключающие домены отличаются друг от друга, например, они представляют собой полипептиды, имеющие различные первичные последовательности, и вместе называются переключателем гетеродимеризации. В воплощениях переключатель является внутриклеточным. В воплощениях переключатель является внеклеточным. В воплощениях переключающий домен представляет собой элемент на основе

полипептида, например, FKBP или на основе FKВ, и димеризующая молекула является небольшой молекулой, например, рапалогом. В воплощениях переключающий домен представляет собой элемент на основе полипептида, например, scFv, который связывает мус пептид, и димеризующая молекула представляет собой полипептид, его фрагмент или полимер полипептида, например, мус лиганд или полимеры мус лиганда, которые связывают один или больше мус scFv. В воплощениях переключающий домен представляет собой элемент на основе полипептида, например, мус рецептор, и димеризующая молекула представляет собой антитело или его фрагменты, например, мус антитело.

«Димеризующая молекула» как термин, используемый в настоящем описании, например, в связи с RCAR, относится к молекуле, которая промотирует ассоциацию первого переключающего домена со вторым переключающим доменом. В воплощениях димеризующая молекула не встречается по природе у субъекта или не встречается в концентрациях, которые приведут к существенной димеризации. В воплощениях димеризующая молекула является небольшой молекулой, например, рапамицина или раполога, например, RAD001.

Термин «биоэквивалент» относится к количеству агента иного, чем эталонное соединение (например, RAD001), требуемому для получения действия, эквивалентного действию, производимому эталонной дозой или эталонным количеством эталонного соединения (например, RAD001). В одном воплощении действие является уровнем ингибирования mTOR, например, при измерении по ингибированию киназы P70 S6, например, по оценке в анализе *in vivo* или *in vitro*, например, при измерении с помощью анализа, описанного в настоящем описании, например, анализа Boulay, или измерении уровней фосфорилированного S6 вестерн-блоттингом. В одном воплощении действием является изменение отношения PD-1-положительные/PD-1-отрицательные Т-клетки при измерении сортированием клеток. В одном воплощении биоэквивалентное количество или доза ингибитора mTOR является количеством или дозой, которые достигают такого же уровня ингибирования киназы P70 S6, как эталонная доза или эталонное количество эталонного соединения. В одном воплощении биоэквивалентное количество или доза ингибитора mTOR является количеством или дозой, которые достигают такого же уровня изменения отношения PD-1-положительные/PD-1-отрицательные Т-клетки, как эталонная доза или эталонное количество эталонного соединения.

Термин «малая иммуностимулирующая доза», когда используется в связи с ингибитором mTOR, например, аллостерическим ингибитором mTOR, например, RAD001 или рапамицином, или каталитическим ингибитором mTOR, относится к дозе ингибитора mTOR, которая частично, но не полностью, ингибирует активность mTOR, при измерении с помощью ингибирования активности киназы P70 S6. Способы оценки активности mTOR, например, с помощью ингибирования киназы P70 S6, обсуждаются в настоящем описании. Доза недостаточна для того, чтобы привести к полной иммунной супрессии, но достаточна для усиления иммунной реакции. В одном воплощении малая иммуностимулирующая доза ингибитора mTOR приводит к уменьшению числа PD-1-положительных Т-клеток и/или повышению числа PD-1-отрицательных Т-клеток, или повышает отношение PD-1-отрицательные Т-клетки/PD-1-положительные Т-клетки. В одном воплощении малая иммуностимулирующая доза ингибитора mTOR приводит к повышению числа наивных Т-клеток. В одном воплощении малая иммуностимулирующая доза ингибитора mTOR приводит к одному или нескольким из следующих изменений:

усиление экспрессии одного или нескольких из следующих маркеров: CD62L^{high},

CD127^{high}, CD27⁺ и BCL2, например, на Т-клетках памяти, например, предшественниках Т-клеток памяти;

уменьшение экспрессии KLRG1, например, на Т-клетках памяти, например, предшественниках Т-клеток памяти; и

повышение числа предшественников Т-клеток памяти, например, клеток с одной из комбинаций следующих характеристик: повышенный CD62L^{high}, повышенный CD127^{high}, повышенный CD27⁺, сниженный KLRG1 и повышенный BCL2;

причем любое из изменений, описанных выше, происходит, например, по меньшей мере временно, например, по сравнению с субъектом, не получавшим лечение.

«Рефрактерный» при использовании в настоящем описании относится к заболеванию, например, раку, которое не реагирует на лечение. В воплощениях рефрактерный рак может быть резистентным к лечению до или при начале лечения. В других воплощениях рефрактерный рак может становиться резистентным во время лечения. Рефрактерным раком также называют резистентный рак.

«Рецидивный» или «рецидив» при использовании в настоящем описании относится к повторному появлению заболевания (например, рака) или признаков и симптомов заболевания, такого как рак, после периода улучшения или восприимчивости, например, после предыдущего курса терапии, например, противораковой терапии. Например, период восприимчивости может включать падение уровня раковых клеток ниже определенного порога, например, ниже 20%, 1%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1%. Повторное появление может включать уровень раковых клеток, превышающих определенный порога, например, выше 20%, 1%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1%.

Интервалы: во всем настоящем раскрытии различные аспекты могут быть представлены в формате интервалов. Следует иметь в виду, что описание в формате интервалов дается только для удобства и краткости и не должно рассматриваться как неизменное ограничение объема изобретения. Соответственно, описание интервала следует рассматривать как конкретно раскрытые все возможные подинтервалы, а также отдельные числовые значения в таком интервале. Например, описание интервала, такого как от 1 до 6, следует рассматривать как имеющее конкретно раскрытые подинтервалы, такие как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т.д., а также как отдельные числа в таком интервале, например, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 и 6. Как другой пример, интервал, такой как идентичность 95-99%, включает что-то с идентичностью 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, и включает подинтервалы, такие как идентичность 96-99%, 96-98%, 96-97%, 97-99%, 97-98% и 98-99%. Это применимо независимо от ширины интервала.

Описание

Настоящее изобретение относится к композициям веществ и способам для применения для лечения заболевания, такого как рак, с использованием химерных антигенных рецепторов (CAR) CLL-1.

В одном аспекте изобретение относится к ряду химерных антигенных рецепторов (CAR), включающих антитело или фрагмент антитела, сконструированные для специфического связывания с белком CLL-1 или его фрагментом. В одном аспекте изобретение относится к клетке (например, иммунной эффекторной клетке, например, Т-клетке или NK-клетке), сконструированной для экспрессии CAR, где CAR Т-клетки («CART») проявляют противоопухолевое свойство. В одном аспекте клетку трансформируют CAR, и по меньшей мере часть конструкции CAR экспрессируется на поверхности клетки. В некоторых воплощениях клетка (например, иммунная

эффекторная клетка, например, Т-клетка или НК-клетка) трансдуцирована вирусным вектором, кодирующим CAR. В некоторых воплощениях вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор. В некоторых воплощениях вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор. В некоторых воплощениях клетка может устойчиво экспрессировать CAR. В другом воплощении клетка (например, иммунная эффекторная клетка, например, Т-клетка или НК-клетка) трансфицирована нуклеиновой кислотой, например, мРНК, кДНК, ДНК, кодирующей CAR. В некоторых воплощениях клетка может временно экспрессировать CAR.

В одном аспекте связывающая часть человеческого анти-CLL-1 белка представляет собой фрагмент антитела scFv. В одном аспекте такие фрагменты антител являются функциональными в том отношении, что они сохраняют эквивалентную аффинность связывания, например, они связывают тот же антиген с эффективностью, сравнимой с антителом IgG, имеющим такие же переменные участки тяжелой и легкой цепи. В одном аспекте такие фрагменты антител являются функциональными в том отношении, что они обеспечивают биологическую реакцию, которая может включать, но не ограничиваться, активацию иммунной реакции, ингибирование происхождения сигнальной трансдукции из ее антигена-мишени, ингибирование киназной активности и т.п., что будет понятно специалистам в данной области техники.

В некоторых аспектах антитела по изобретению включаются в химерный антигенный рецептор (CAR). В одном аспекте CAR включает полипептидную последовательность, представленную в настоящем описании как SEQ ID NO: 91-103.

В одном аспекте анти-CLL-1 связывающий домен, например, человеческий scFv, часть CAR по изобретению кодируется трансгеном, последовательность которого является кодоном, оптимизированным для экспрессии в клетке млекопитающего. В одном аспекте вся конструкция CAR по изобретению кодируется трансгеном, полная последовательность которого является кодоном, оптимизированным для экспрессии в клетке млекопитающего. Оптимизация кодона относится к открытию, что частота появления синонимичных кодонов (т.е., кодонов, которые кодируют одну и ту же аминокислоту) в кодирующей ДНК смещена в различных видах. Такое вырождение кодонов допускает, чтобы идентичный полипептид был кодирован несколькими нуклеотидными последовательностями. Ряд способов оптимизации кодонов известен в технике и включает, например, способы, раскрытые, как минимум, в патентах США №№ 5786464 и 6114148.

В одном аспекте человеческий CLL-1-связывающий домен включает часть scFv, представленную в SEQ ID NO: 39-51. В одном воплощении человеческий анти-CLL-1 связывающий домен включает часть scFv, представленную в SEQ ID NO: 39. В одном воплощении человеческий анти-CLL-1 связывающий домен включает часть scFv, представленную в SEQ ID NO: 40. В одном воплощении человеческий анти-CLL-1 связывающий домен включает часть scFv, представленную в SEQ ID NO: 41. В одном воплощении человеческий анти-CLL-1 связывающий домен включает часть scFv, представленную в SEQ ID NO: 42. В одном воплощении человеческий анти-CLL-1 связывающий домен включает часть scFv, представленную в SEQ ID NO: 43. В одном воплощении человеческий анти-CLL-1 связывающий домен включает часть scFv, представленную в SEQ ID NO: 44. В одном воплощении человеческий анти-CLL-1 связывающий домен включает часть scFv, представленную в SEQ ID NO: 45. В одном воплощении человеческий анти-CLL-1 связывающий домен включает часть scFv, представленную в SEQ ID NO: 46. В одном воплощении человеческий анти-CLL-1 связывающий домен включает часть scFv, представленную в SEQ ID NO: 47. В одном

воплощении человеческий анти-CLL-1 связывающий домен включает часть scFv, представленную в SEQ ID NO: 48. В одном воплощении человеческий анти-CLL-1 связывающий домен включает часть scFv, представленную в SEQ ID NO: 49. В одном воплощении человеческий анти-CLL-1 связывающий домен включает часть scFv, представленную в SEQ ID NO: 50. В одном воплощении человеческий анти-CLL-1 связывающий домен включает часть scFv, представленную в SEQ ID NO: 51. В одном аспекте CAR по изобретению объединяют антигенсвязывающий домен специфического антитела с внутриклеточной сигнальной молекулой. Например, в некоторых аспектах внутриклеточная сигнальная молекула включает, но не ограничивается перечисленным, цепь CD3-дзета, сигнальные молекулы 4-1BB и CD28 и их комбинации. В одном аспекте антигенсвязывающий домен связывается с CLL-1. В одном аспекте CLL-1-CAR включает CAR, выбранный из последовательности, представленной в одной или нескольких SEQ ID NO: 91-103 или 197. В одном аспекте CLL-1-CAR включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 91. В одном аспекте CLL-1-CAR включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 92. В одном аспекте CLL-1-CAR включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 93. В одном аспекте CLL-1-CAR включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 94. В одном аспекте CLL-1-CAR включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 95. В одном аспекте CLL-1-CAR включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 96. В одном аспекте CLL-1-CAR включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 97. В одном аспекте CLL-1-CAR включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 98. В одном аспекте CLL-1-CAR включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 99. В одном аспекте CLL-1-CAR включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 100. В одном аспекте CLL-1-CAR включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 101. В одном аспекте CLL-1-CAR включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 102. В одном аспекте CLL-1-CAR включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 103. В одном аспекте CLL-1-CAR включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 197. Кроме того, настоящее изобретение относится к композициям CLL-1-CAR и их применению в лекарственных средствах и способах лечения, в числе других заболеваний, рака или любой злокачественности или аутоиммунных заболеваний с участием тканей или клеток, которые экспрессируют CLL-1.

В одном аспекте CAR по изобретению можно использовать для устранения CLL-1-экспрессирующих здоровых клеток, посредством чего они пригодны для применения в качестве терапии кондиционирования клеток перед трансплантацией клеток. В одном аспекте CLL-1-экспрессирующие здоровые клетки представляют собой CLL-1-экспрессирующие здоровые стволовые клетки, и трансплантация клеток является трансплантацией стволовых клеток.

В одном аспекте изобретение относится к клетке (например, иммунной эффекторной клетке, например, Т-клетке или NK-клетке), сконструированной для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR) по настоящему изобретению, причем клетка (например, CAR-экспрессирующая иммунная эффекторная клетка, например, CAR Т-клетка, например, «CART») проявляет противоопухолевое свойство. Предпочтительным антигеном является CLL-1. В одном аспекте антигенсвязывающий домен CAR включает фрагмент человеческого анти-CLL-1 антитела. В одном аспекте антигенсвязывающий домен CAR включает фрагмент человеческого анти-CLL-1 антитела, включающий scFv. В одном аспекте антигенсвязывающий домен CAR включает человеческий анти-CLL-1 scFv. Соответственно, изобретение относится к CLL-1-CAR, который включает анти-

CLL-1 связывающий домен и встроен в иммунную эффекторную клетку, например, Т-клетку или НК-клетку), и способам его применения для адоптивной терапии. В одном аспекте CLL-1-CAR включает человеческий анти-CLL-1 связывающий домен.

В одном аспекте CLL-1-CAR включает по меньшей мере один внутриклеточный домен, выбранный из группы из сигнального домена CD137 (4-1BB), сигнального домена CD28, сигнального домена CD3-дзета и их любой комбинации. В одном аспекте CLL-1-CAR включает по меньшей мере один внутриклеточный домен, выбранный из одной или нескольких костимулирующих молекул иных, чем CD137 (4-1BB) или CD28.

Химерный антигенный рецептор (CAR)

Настоящее изобретение относится к CAR (например, полипептиду CAR), который включает анти-CLL-1 связывающий домен (например, человеческий или гуманизированный анти-CLL-1 связывающий домен, описанный в настоящем описании), трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, и где указанный анти-CLL-1 связывающий домен включает определяющий комплементарность участок тяжелой цепи 1 (НС CDR1), определяющий комплементарность участок тяжелой цепи 2 (НС CDR2) и определяющий комплементарность участок тяжелой цепи 3 (НС CDR3) любой из аминокислотных последовательностей тяжелой цепи анти-CLL-1 связывающего домена, внесенных в список в таблице 2. Анти-CLL-1 связывающий домен CAR может дополнительно включать участок легкой цепи 1 (LC CDR1), определяющий комплементарность участок легкой цепи 2 (LC CDR2) и определяющий комплементарность участок легкой цепи 3 (LC CDR3) любой из аминокислотных последовательностей легкой цепи анти-CLL-1 связывающего домена, внесенных в список в таблице 2.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, описанный в настоящем описании, например, кодирующей CAR, который включает анти-CLL-1 связывающий домен (например, человеческий или гуманизированный CLL-1-связывающий домен, описанный в настоящем описании), трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, и где указанный анти-CLL-1 связывающий домен включает определяющий комплементарность участок тяжелой цепи 1 (НС CDR1), определяющий комплементарность участок тяжелой цепи 2 (НС CDR2) и определяющий комплементарность участок тяжелой цепи 3 (НС CDR3) любой из аминокислотных последовательностей тяжелой цепи анти-CLL-1 связывающего домена, внесенных в список в таблице 2.

В одном воплощении анти-CLL-1 связывающий домен CAR может дополнительно включать участок легкой цепи 1 (LC CDR1), определяющий комплементарность участок легкой цепи 2 (LC CDR2) и определяющий комплементарность участок легкой цепи 3 (LC CDR3) любой из аминокислотных последовательностей легкой цепи анти-CLL-1 связывающего домена, внесенных в список в таблице 2.

В конкретных аспектах конструкция CAR по изобретению включает scFv домен, выбранный из группы, включающей SEQ ID NO: 39-51, scFv, которому может предшествовать необязательная лидерная последовательность, такая как представленная в SEQ ID NO: 1, и за которым может следовать необязательная шарнирная последовательность, такая как представленная в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5, трансмембранный участок, такой как представленный в SEQ ID NO: 6, внутриклеточный сигнальный домен, который включает SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8, и последовательность CD3-дзета, которая включает SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, например, где домены являются смежными и в одной и той же рамке считывания, образуя отдельный слитый белок. В изобретение также включена

нуклеотидная последовательность, которая кодирует полипептид каждого из фрагментов scFv, выбранная из группы, включающей SEQ ID NO: 39-51. В изобретение также включена нуклеотидная последовательность, которая кодирует полипептид каждого из фрагментов scFv, выбранная из группы, включающей SEQ ID NO: 39-51, и каждый из доменов SEQ ID NO: 1, 2 и 6-9. В одном аспекте пример конструкции CLL-1-CAR включает необязательную лидерную последовательность, внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнир, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен.

В некоторых воплощениях полноразмерные последовательности CAR также представлены в настоящем описании как SEQ ID NO: 91-103, показанные в таблице 2.

Пример лидерной последовательности представлен как SEQ ID NO: 1. Пример шарнирной/спейсерной последовательности представлен как SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3. Пример последовательности трансмембранного домена представлен как SEQ ID NO: 6. Пример последовательности внутриклеточного сигнального домена белка 4-1BB представлен как SEQ ID NO: 7. Пример последовательности внутриклеточного сигнального домена CD27 представлен как SEQ ID NO: 8. Пример последовательности домена CD3-дзета представлен как SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10.

В одном аспекте настоящее изобретение охватывает конструкцию рекомбинантной нуклеиновой кислоты, включающую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, где молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность, кодирующую CLL-1-связывающий домен, например, описанный в настоящем описании, например, смежный с и в той же рамке считывания, что и нуклеотидная последовательность, кодирующая внутриклеточный сигнальный домен. В одном аспекте CLL-1-связывающий домен выбирают из одной или нескольких SEQ ID NO: 39-51. В одном воплощении CLL-1-связывающий домен включает SEQ ID NO: 39. В одном воплощении CLL-1-связывающий домен включает SEQ ID NO: 40. В одном воплощении CLL-1-связывающий домен включает SEQ ID NO: 41. В одном воплощении CLL-1-связывающий домен включает SEQ ID NO: 42. В одном воплощении CLL-1-связывающий домен включает SEQ ID NO: 43. В одном воплощении CLL-1-связывающий домен включает SEQ ID NO: 44. В одном воплощении CLL-1-связывающий домен включает SEQ ID NO: 45. В одном воплощении CLL-1-связывающий домен включает SEQ ID NO: 46. В одном воплощении CLL-1-связывающий домен включает SEQ ID NO: 47. В одном воплощении CLL-1-связывающий домен включает SEQ ID NO: 48. В одном воплощении CLL-1-связывающий домен включает SEQ ID NO: 49. В одном воплощении CLL-1-связывающий домен включает SEQ ID NO: 50. В одном воплощении CLL-1-связывающий домен включает SEQ ID NO: 51.

В одном аспекте настоящее изобретение охватывает конструкцию рекомбинантной нуклеиновой кислоты, включающую трансген, кодирующий CAR, где молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CLL-1 связывающий домен, выбранный из одной или нескольких последовательностей SEQ ID NO: 39-51, где последовательность является смежной с или в той же рамке считывания, что и нуклеотидная последовательность, кодирующая внутриклеточный сигнальный домен. Пример внутриклеточного сигнального домена, который может быть использован в CAR, включает, но не ограничивается перечисленным, один или больше внутриклеточных сигнальных доменов, например, CD3-дзета, CD28, 4-1BB и т.п. В некоторых случаях CAR может включать любую комбинацию CD3-дзета, CD28, 4-1BB и т.п. В одном аспекте нуклеотидную последовательность конструкции CAR по изобретению выбирают из одной или нескольких SEQ ID NO: 104-116 или 198. В одном

аспекте нуклеотидная последовательность конструкции CAR представляет собой SEQ ID NO: 104. В одном аспекте нуклеотидная последовательность конструкции CAR представляет собой SEQ ID NO: 105. В одном аспекте нуклеотидная последовательность конструкции CAR представляет собой SEQ ID NO: 106. В одном аспекте нуклеотидная последовательность конструкции CAR представляет собой SEQ ID NO: 107. В одном аспекте нуклеотидная последовательность конструкции CAR представляет собой SEQ ID NO: 108. В одном аспекте нуклеотидная последовательность конструкции CAR представляет собой SEQ ID NO: 109. В одном аспекте нуклеотидная последовательность конструкции CAR представляет собой SEQ ID NO: 110. В одном аспекте нуклеотидная последовательность конструкции CAR представляет собой SEQ ID NO: 111. В одном аспекте нуклеотидная последовательность конструкции CAR представляет собой SEQ ID NO: 112. В одном аспекте нуклеотидная последовательность конструкции CAR представляет собой SEQ ID NO: 113. В одном аспекте нуклеотидная последовательность конструкции CAR представляет собой SEQ ID NO: 114. В одном аспекте нуклеотидная последовательность конструкции CAR представляет собой SEQ ID NO: 115. В одном аспекте нуклеотидная последовательность конструкции CAR представляет собой SEQ ID NO: 116. В одном аспекте нуклеотидная последовательность конструкции CAR представляет собой SEQ ID NO: 198. Нуклеотидные последовательности, кодирующие нужные молекулы, можно получить с использованием рекомбинантных методов, известных в технике, таких как, например, скрининг библиотек из клеток, экспрессирующих ген, образование гена из вектора, известного как включающего их, или выделение прямо из клеток и тканей, содержащих их, с использованием стандартных методов. С другой стороны, представляющую интерес нуклеиновую кислоту можно получить синтетически, а не клонированием.

Настоящее изобретение включает конструкции ретровирусных и лентивирусных векторов, экспрессирующие CAR, которые могут быть непосредственно трансдуцированы в клетку.

Настоящее изобретение включает конструкцию РНК, которая может быть непосредственно трансдуцирована в клетку. Способ генерации мРНК для применения в трансфекции включает транскрипцию *in vitro* (IVT) матрицы с помощью специально созданных праймеров с последующим присоединением поли(А) для получения конструкции, содержащей 3'- и 5'-нетранслируемую последовательность («UTR»), 5'-кэп и/или внутренний сайт входа рибосомы (IRES), нуклеиновую кислоту, которую экспрессируют, и хвост поли(А) типично в 50-2000 оснований в длину (SEQ ID NO: 35). Полученная таким образом РНК может эффективно трансфицировать различные виды клеток. В одном воплощении матрица включает последовательности для CAR. В одном воплощении РНК-CAR вектор трансдуцируют в Т-клетку путем электропорации.

Антигенсвязывающий домен

CAR по настоящему изобретению включают мишень-специфический связывающий домен. Выбор группы зависит от типа и числа лигандов, которые определяют поверхность клетки-мишени. Например, антигенсвязывающий домен можно выбрать для узнавания лиганда, который действует как маркер клеточной поверхности на клетках-мишенях, связанных с определенным болезненным состоянием. Так, примеры маркеров клеточной поверхности, которые могут действовать как лиганды для антигенсвязывающего домена в CAR по изобретению, включают маркеры, ассоциированные с вирусными, бактериальными и паразитарными инфекциями, аутоиммунным заболеванием и раковыми клетками.

В одном аспекте CAR-опосредуемая Т-клеточная реакция может быть направлена

на антиген, представляющий интерес, путем конструирования антигенсвязывающего домена, который специфически связывает нужный антиген в CAR.

В одном аспекте CAR по настоящему изобретению включает связывающий домен, который специфически связывает CLL-1. В одном аспекте антигенсвязывающий домен специфически связывает человеческий CLL-1.

Антигенсвязывающий домен может представлять собой любой домен, который связывается с антигеном, включая, но не ограничиваясь перечисленным, моноклональное антитело, поликлональное антитело, рекомбинантное антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, его функциональный фрагмент, включая, но не ограничиваясь перечисленным, однодоменное антитело, такое как переменный домен тяжелой цепи (VH), переменный домен легкой цепи (VL) и переменный домен (VNH) нанотела от камелидов, и с другой стороны, каркас, известный в технике как функционирующий как антигенсвязывающий домен, такой как домен рекомбинантного фибронектина, и т.п. В некоторых случаях благоприятно получать антигенсвязывающий домен от того же вида, в котором в конечном счете будет применен CAR. Например, для применения людьми может быть благоприятно, чтобы антигенсвязывающий домен CAR включал человеческие или гуманизированные остатки для антигенсвязывающего домена антитела или фрагмента антитела.

В некоторых случаях благоприятно получать антигенсвязывающий домен из того же вида, в котором в конечном счете будет применен CAR. Например, для применения людьми может быть благоприятно, чтобы антигенсвязывающий домен CAR включал человеческие или гуманизированные остатки для антигенсвязывающего домена антитела или фрагмента антитела. Так, в одном аспекте антигенсвязывающий домен включает человеческое антитело или фрагмент такого антитела.

Так, в одном аспекте антигенсвязывающий домен включает человеческое антитело или фрагмент такого антитела. В одном воплощении человеческий анти-CLL-1 связывающий домен включает один или больше участков (например, все три) из определяющего комплементарность участка 1 легкой цепи (LC CDR1), определяющего комплементарность участка 2 легкой цепи (LC CDR2) и определяющего комплементарность участка 3 легкой цепи (LC CDR3) человеческого анти-CLL-1 связывающего домена, описанного в настоящем описании, и/или один или больше участков (например, все три) из определяющего комплементарность участка 1 тяжелой цепи (HC CDR1), определяющего комплементарность участка 2 тяжелой цепи (HC CDR2) и определяющего комплементарность участка 3 тяжелой цепи (HC CDR3) человеческого анти-CLL-1 связывающего домена, описанного в настоящем описании, например, человеческого анти-CLL-1-связывающего домена, включающего один или больше, например, все три, LC CDR и один или больше, например, все три, HC CDR. В одном воплощении человеческий анти-CLL-1 связывающий домен включает один или больше участков (например, все три) из определяющего комплементарность участка 1 тяжелой цепи (HC CDR1), определяющего комплементарность участка 2 тяжелой цепи (HC CDR2) и определяющего комплементарность участка 3 тяжелой цепи (HC CDR3) человеческого анти-CLL-1 связывающего домена, описанного в настоящем описании, например, человеческий анти-CLL-1 связывающий домен имеет два переменных участка тяжелой цепи, причем каждый содержит HC CDR1, HC CDR2 и HC CDR3, описанные в настоящем описании. В одном воплощении человеческий анти-CLL-1 связывающий домен включает человеческий переменный домен легкой цепи, описанный в настоящем описании (например, в таблице 4), и/или человеческий переменный домен тяжелой цепи, описанный в настоящем описании (например, в

таблице 3). В одном воплощении человеческий анти-CLL-1 связывающий домен включает человеческий вариабельный домен тяжелой цепи, описанный в настоящем описании (например, в таблице 3), например, по меньшей мере два вариабельных участка тяжелой цепи, описанных в настоящем описании (например, в таблице 3). В одном воплощении анти-CLL-1 связывающий домен представляет собой scFv, включающий легкую цепь и тяжелую цепь аминокислотной последовательности из таблицы 4. В одном воплощении анти-CLL-1 связывающий домен (например, scFv) включает вариабельный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены, например, консервативные замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен, например, консервативных замен) аминокислотной последовательности вариабельного участка легкой цепи, представленной в таблице 4, или последовательность с 95-99% идентичностью аминокислотной последовательности из таблицы 4; и/или вариабельный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены, например, консервативные замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен, например, консервативных замен) аминокислотной последовательности вариабельного участка тяжелой цепи, представленной в таблице 3, или последовательность с 95-99% идентичностью аминокислотной последовательности из таблицы 3. В одном воплощении человеческий анти-CLL-1 связывающий домен включает последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 39-51, или последовательность с 95-99% идентичностью ей. В одном воплощении нуклеотидная последовательность, кодирующая человеческий анти-CLL-1 связывающий домен, включает последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 52-64, или последовательность с 95-99% идентичностью ей. В одном воплощении человеческий анти-CLL-1 связывающий домен представляет собой scFv, и вариабельный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, описанную в настоящем описании, например, в таблице 2, присоединяется к вариабельному участку тяжелой цепи, включающему аминокислотную последовательность, описанную в настоящем описании, например, в таблице 2, через линкер, например, линкер, описанный в настоящем описании. В одном воплощении человеческий анти-CLL-1 связывающий домен включает линкер (Gly₄-Ser)_n, где n равен 1, 2, 3, 4, 5 или 6, предпочтительно 3 или 4 (SEQ ID NO: 26). Вариабельный участок легкой цепи и вариабельный участок тяжелой цепи scFv могут находиться, например, в любой из следующих ориентаций: вариабельный участок легкой цепи - линкер - вариабельный участок тяжелой цепи или вариабельный участок тяжелой цепи - линкер - вариабельный участок легкой цепи.

В одном аспекте часть антигенсвязывающего домена включает одну или больше последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 39-41. В одном аспекте CAR выбирают из одной или нескольких последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 91-103 или 197.

В одном аспекте анти-CLL-1 связывающий домен характеризуется определенными функциональными особенностями или свойствами антитела или фрагмента антитела. Например, в одном аспекте часть композиции CAR по изобретению, которая включает антигенсвязывающий домен, специфически связывает человеческий CLL-1.

В одном аспекте изобретение относится к антигенсвязывающему домену, включающему антитело или фрагмент антитела, где связывающий домен антитела специфически связывается с белком CLL-1 или его фрагментом, где антитело или фрагмент антитела включает вариабельную легкую цепь и/или вариабельную тяжелую

цепь, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39-51. В одном аспекте антигенсвязывающий домен включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39-51. В некоторых аспектах scFv является смежным с и в той же рамке считывания, что и лидерная последовательность. В одном аспекте лидерная последовательность представляет собой полипептидную последовательность SEQ ID NO: 1.

В одном аспекте человеческий анти-CLL-1 связывающий домен представляет собой фрагмент, например, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv). В одном аспекте человеческий анти-CLL-1 связывающий домен представляет собой Fv, Fab, (Fab')₂ или бифункциональное (например, биспецифическое) гибридное антитело (см., например, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol., 17, 105 (1987)). В одном аспекте антитела и их фрагменты по изобретению связывают белок CLL-1 или его фрагмент с аффинностью дикого типа или усиленной аффинностью.

В некоторых случаях человеческий scFv получают из библиотеки дисплеев.

Библиотека дисплеев представляет собой набор элементов; каждый элемент включает доступный полипептидный компонент и возмestimый компонент, который кодирует или идентифицирует полипептидный компонент. Полипептидный компонент варьируется таким образом, что представляются различные аминокислотные последовательности. Полипептидный компонент может иметь любую длину, например, от трех аминокислот до более 300 аминокислот. Элемент библиотеки дисплеев может включать более одного полипептидного компонента, например, две полипептидные цепи Fab. В одном примере воплощения библиотеку дисплеев можно использовать для идентификации человеческого CLL-1-связывающего домена. При отборе полипептидный компонент каждого члена библиотеки зондируют с CLL-1 или его фрагментом, и если полипептидный компонент связывается с CLL-1, член библиотеки дисплеев идентифицируют, типично путем удерживания на носителе.

Удержанные члены библиотеки дисплеев извлекают из носителя и анализируют. Анализ может включать амплификацию и последующую селекцию в схожих или различных условиях. Например, можно чередовать положительную и отрицательную селекцию. Анализ также может включать определение аминокислотной последовательности полипептидного компонента, т.е., CLL-1-связывающего домена, и очистку полипептидного компонента для подробной характеристики.

Ряд форматов можно использовать для библиотек дисплеев. Примеры включают фаговый дисплей. В фаговом дисплее белковый компонент типично ковалентно соединен с белком фаговой оболочки. Связь является результатом трансляции нуклеиновой кислоты, кодирующей белковый компонент, слитый с белком оболочки. Связь может включать жесткий пептидный линкер, протеазный сайт или аминокислоту, внедренную в результате супрессии стоп-кодона. Фаговый дисплей описан, например, в U.S. 5223409; Smith (1985), *Science*, 228: 1315-1317; WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; WO 90/02809; de Haard et al. (1999), *J. Biol. Chem.*, 274: 18218-30; Hoogenboom et al. (1998), *Immunotechnology*, 4: 1-20; Hoogenboom et al. (2000), *Immunol. Today*, 2: 371-8, и Hoet et al. (2005), *Nat. Biotechnol.*, 23(3), 344-8. Отображение бактериофагов белкового компонента можно вырастить и харвестировать с использованием стандартных методов получения фагов, например, преципитацией ПЭГ из культуральной среды. После селекции отдельных фаговых дисплеев нуклеиновую кислоту, кодирующую выбранные белковые компоненты, можно выделить из клеток, инфицированных выбранными фагами, или из самих фагов после амплификации. Отдельные колонии или бляшки можно пикировать, нуклеиновую кислоту изолируют

и секвенируют.

Другие форматы дисплеев включают клеточный дисплей (см., например, WO 03/029456), гибриды белок-нуклеиновая кислота (см., например, US 6207446), рибосомный дисплей (см., например, Mattheakis *et al.* (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 9022; и Hanes *et al.* (2000), *Nat. Biotechnol.*, 18: 1287-92; Hanes *et al.* (2000) *Methods Enzymol.*, 328: 404-30; и Schaffitzel *et al.* (1999), *J. Immunol. Methods*, 231(1-2): 119-35), и периплазматический дисплей *E. coli* (2005, Nov. 22; PMID: 16337958).

В некоторых случаях scFv можно получить согласно способу, известному в технике (см., например, Bird *et al.*, (1988), *Science*, 242: 423-426; и Huston *et al.*, (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5879-5883). Молекулы scFv можно получить, соединяя участки VH и VL вместе с использованием жестких полипептидных линкеров. Молекулы scFv включают линкер (например, линкер Ser-Gly) оптимизированной длины и/или композиции аминокислот. Длина линкера может существенно влиять как на сложение, так и на взаимодействие переменных участков scFv. Действительно, если используют короткий полипептидный линкер (например, в 5-10 аминокислот), предотвращается внутрицепной (intrachain) фолдинг. Внутрицепной фолдинг также требуется для того, чтобы свести два переменных участка вместе с образованием функционального сайта связывания эпитопа. Например, об ориентации и размере линкера см., например, Hollinger *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90: 6444-6448, публикации заявок на патент США №№ 2005/0100543, 2005/0175606, 2007/0014794, и публикации РСТ №№ WO2006/020258 и WO2007/024715, включенные в настоящее описание в качестве ссылок.

Фрагмент scFv может включать между его участками VH и VL линкер с по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или большим числом аминокислотных остатков. Линкерная последовательность может включать любую встречающуюся в природе аминокислоту. В некоторых воплощениях линкерная последовательность включает аминокислоты глицин и серин. В другом воплощении линкерная последовательность включает наборы из повторов глицина и серина, таких как (Gly₄Ser)_n, где n представляет собой положительное целое число, равное или больше единицы (SEQ ID NO: 25). В одном воплощении линкер может представлять собой (Gly₄Ser)₄ (SEQ ID NO: 27) или (Gly₄Ser)₃ (SEQ ID NO: 28). Изменение в длине линкера может сохранить или усилить активность, давая развитие превосходной эффективности в исследованиях активности.

Примеры конструкций человеческого CLL-1-CAR и антигенсвязывающих доменов

Примеры конструкций CLL-1-CAR, раскрытые в настоящем описании, включают scFv (например, человеческий scFv, как раскрыто в таблице 2 в настоящем описании, необязательно с предшествующей лидерной последовательностью, например, SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 12, например, лидерными аминокислотной и нуклеотидной последовательностями, соответственно). Последовательности фрагментов человеческого scFv (аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 39-51 и нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 52-64) приводятся в настоящем описании в таблице 2. Конструкция CLL-1-CAR может дополнительно включать необязательный шарнирный домен, например, шарнирный домен CD8 (например, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или кодированный нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 13); трансмембранный домен, например, трансмембранный домен CD8 (например, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или кодированный нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 17); внутриклеточный домен, например, 4-1BB внутриклеточный домен 4-1BB (например, включающий аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 7 или кодированный нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 18); и функциональный сигнальный домен, например, домен CD3-дзета (например, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или 10 или кодированный нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 20 или 21). В некоторых воплощениях домены являются смежными и находятся в одной и той же рамке считывания, образуя отдельный слитый белок. В других воплощениях домены находятся в различных полипептидах, например, как в молекуле RCAR, как описано в настоящем описании.

В некоторых воплощениях полноразмерная молекула CLL-1-CAR включает аминокислотную последовательность или кодируется нуклеотидной последовательностью CLL-1-CAR-1, CLL-1-CAR-2, CLL-1-CAR-3, CLL-1-CAR-4, CLL-1-CAR-5, CLL-1-CAR-6, CL-L1-CAR-7, CLL-1-CAR-8, CLL-1-CAR-9, CLL-1-CAR-10, CLL-1-CAR-11, CLL-1-CAR-12, CLL-1-CAR-13, 181268, приведенными в таблице 2, или последовательностью по существу идентичную (например, на 95-99%) им.

В некоторых воплощениях молекула CLL-1-CAR или анти-CLL-1 антигенсвязывающий домен включает аминокислотную последовательность scFv CLL-1-CAR-1, CLL-1-CAR-2, CLL-1-CAR-3, CLL-1-CAR-4, CLL-1-CAR-5, CLL-1-CAR-6, CL-L1-CAR-7, CLL-1-CAR-8, CLL-1-CAR-9, CLL-1-CAR-10, CLL-1-CAR-11, CLL-1-CAR-12, CLL-1-CAR-13, 181268, приведенную в таблице 2, или включает аминокислотную последовательность scFv или кодируется нуклеотидной последовательностью CLL-1-CAR-1, CLL-1-CAR-2, CLL-1-CAR-3, CLL-1-CAR-4, CLL-1-CAR-5, CLL-1-CAR-6, CL-L1-CAR-7, CLL-1-CAR-8, CLL-1-CAR-9, CLL-1-CAR-10, CLL-1-CAR-11, CLL-1-CAR-12, CLL-1-CAR-13, 181268, или последовательностью, по существу идентичную (например, на 95-99%) или с изменениями аминокислот до 20, 15, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2 или 1, например, заменами (например, консервативными заменами) в любой из вышеуказанных последовательностей.

В некоторых воплощениях молекула CLL-1-CAR или анти-CLL-1 антигенсвязывающий домен включает вариабельный участок тяжелой цепи и/или вариабельный участок легкой цепи CLL-1-CAR-1, CLL-1-CAR-2, CLL-1-CAR-3, CLL-1-CAR-4, CLL-1-CAR-5, CLL-1-CAR-6, CL-L1-CAR-7, CLL-1-CAR-8, CLL-1-CAR-9, CLL-1-CAR-10, CLL-1-CAR-11, CLL-1-CAR-12, CLL-1-CAR-13, 181268, представленные в таблице 2, или последовательность по существу идентичную (например, на 95-99% идентичную или с изменениями аминокислот до 20, 15, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2 или 1, например, заменами (например, консервативными заменами)) любой из вышеуказанных последовательностей.

В некоторых воплощениях молекула CLL-1-CAR или анти-CLL-1 антигенсвязывающий домен включает один, два или три CDR из вариабельного участка тяжелой цепи (например, HCCDR1, HCCDR2 и/или HCCDR3), представленных в таблице 3; и/или один, два или три CDR из вариабельного участка легкой цепи (например, LCCDR1, LCCDR2 и/или LCCDR3) CLL-1-CAR-1, CLL-1-CAR-2, CLL-1-CAR-3, CLL-1-CAR-4, CLL-1-CAR-5, CLL-1-CAR-6, CL-L1-CAR-7, CLL-1-CAR-8, CLL-1-CAR-9, CLL-1-CAR-10, CLL-1-CAR-11, CLL-1-CAR-12, CLL-1-CAR-13, 181268, представленных в таблице 4; или последовательность по существу идентичную (например, на 95-99% идентичную или с изменениями аминокислот до 5, 4, 3, 2 или 1, например, заменами (например, консервативными заменами)) любой из вышеуказанных последовательностей.

В некоторых воплощениях молекула CLL-1-CAR или анти-CLL-1 антигенсвязывающий домен включает один, два или три CDR из вариабельного участка тяжелой цепи (например, HCCDR1, HCCDR2 и/или HCCDR3), представленных в таблице 5; и/или один, два или три CDR из вариабельного участка легкой цепи (например, LCCDR1, LCCDR2 и/или LCCDR3), CLL-1-CAR-1, CLL-1-CAR-2, CLL-1-CAR-3, CLL-1-CAR-4, CLL-1-CAR-

5, CLL-1-CAR-6, CL-L1-CAR-7, CLL-1-CAR-8, CLL-1-CAR-9, CLL-1-CAR-10, CLL-1-CAR-11, CLL-1-CAR-12, CLL-1-CAR-13, 181268, представленных в таблице 6; или последовательность по существу идентичную (например, на 95-99% идентичную или с изменениями аминокислот до 5, 4, 3, 2 или 1, например, заменами (например, консервативными заменами)) любой из вышеуказанных последовательностей.

В некоторых воплощениях молекула CLL-1-CAR или анти-CLL-1 антигенсвязывающий домен включает один, два или три CDR из вариабельного участка тяжелой цепи (например, HCCDR1, HCCDR2 и/или HCCDR3), представленных в таблице 7; и/или один, два или три CDR из вариабельного участка легкой цепи (например, LCCDR1, LCCDR2 и/или LCCDR3), CLL-1-CAR-1, CLL-1-CAR-2, CLL-1-CAR-3, CLL-1-CAR-4, CLL-1-CAR-5, CLL-1-CAR-6, CL-L1-CAR-7, CLL-1-CAR-8, CLL-1-CAR-9, CLL-1-CAR-10, CLL-1-CAR-11, CLL-1-CAR-12, CLL-1-CAR-13, 181268, представленных в таблице 8; или последовательность по существу идентичную (например, на 95-99% идентичную или с изменениями аминокислот до 5, 4, 3, 2 или 1, например, заменами (например, консервативными заменами)) любой из вышеуказанных последовательностей.

Последовательности гуманизированных CDR доменов scFv приводятся в таблицах 3, 5 и 7 для вариабельных доменов тяжелой цепи и в таблицах 4, 6 и 8 для вариабельных доменов легкой цепи. «ID» обозначает соответствующий SEQ ID NO для каждого CDR.

CDR, приведенные в таблицах 3 и 4, соответствуют комбинации схем нумерации Кабата и Чотиа.

Таблица 3. CDR вариабельных доменов тяжелой цепи

Кандидат	HCDR1	ID	HCDR2	ID	HCDR3	ID
CLL-1-CAR 9	ANTFSDHVMH	125	YIHAANGGTHYSQKFQD	138	GGYNDAFDI	151
CLL-1-CAR 6	GGFSFGYYWS	122	EINHSGSTNYNPSLKS	135	GSGLVVYAIRVGSGWFDY	148
CLL-1-CAR 10	GFTFSSYSMN	126	YISSSSSTIYYADSVKG	139	DLSVRAIDAFDI	152
CLL-1-CAR 11	GFTFNSYGLH	127	LIEYDGSNKYYGDSVKG	140	EGNEDLAFDI	153
CLL-1-CAR 12	GFNVSSNYMT	128	VIYSGGATYYGDSVKG	141	DRLYCGNNCYLYYYGMDV	154
CLL-1-CAR 1	GGTFSSY AIS	117	GIPIFGTANYAQKFQ	130	DLEMATIMGGY	143
CLL-1-CAR 2	GFTFDDYAMH	118	LISGDGGSTYYADSVKG	131	VFDSYYMDV	144
CLL-1-CAR 3	GGSISSSYWYG	119	SIYYSGSTYYNPSLKS	132	PGTYDFLSGYYPFY	145
CLL-1-CAR 4	GFTFSSYWMS	120	NINEDGSAKFYVDSVKG	133	DLRSGRY	146
CLL-1-CAR 5	GGPVRSGSHYWN	121	YIYYSGSTNYNPSLEN	134	GTATFDWNFPFDS	147
CLL-1-CAR 7	GFTFSSYSMN	123	SISSSSSYIYYADSVKG	136	DPSSSGSYMEDSYYYGMDV	149
CLL-1-CAR 8	GFTFSSYEMN	124	YISSSGSTIYYADSVKG	137	EALGSSWE	150
CLL-1-CAR 13	GYPFTGYIQ	129	WIDPNSGNTGYAQKFQ	142	DSYGYYYGMDV	155
181268	GFTFSSYEMN	199	YISSSGSTIYYADSVKG	200	DPYSSSWHDAFDI	201

Таблица 4. CDR вариабельных доменов легкой цепи

Кандидат	LCDR1	ID	LCDR2	ID	LCDR3	ID
CLL-1-CAR 9	RASQDISSWLA	164	AASSLQS	177	QQSYSTPLT	190
CLL-1-CAR 6	RASQSISSYLN	161	AASSLQS	174	QQSYSTPPWT	187
CLL-1-CAR 10	QASQDISNYLN	165	DASNLET	178	QQAYSTPFT	191
CLL-1-CAR 11	QASQFIKKNLN	166	DASSLQT	179	QQHDNLPLT	192
CLL-1-CAR 12	RASQSISSYLN	167	AASSLQS	180	QQSYSTPPLT	193
CLL-1-CAR 1	TGTSSDVGGYNYVS	156	DVSNRPS	169	SSYTSSSTLDVV	182
CLL-1-CAR 2	RSSQSLVYTDGNTYLN	157	KVSNRDS	170	MQGTHWSFT	183
CLL-1-CAR 3	RASQGISSYLA	158	AASLQS	171	QQLNSYPYT	184
CLL-1-CAR 4	RASQISGSFLA	159	GASSRAT	172	QQYGSSPPT	185
CLL-1-CAR 5	RASQSISSYLN	160	AASSLQS	173	QQSYSTPWT	186
CLL-1-CAR 7	TGSSGSIASNYVQ	162	EDNQRPS	175	QSYDSSNQVV	188
CLL-1-CAR 8	QASQDISNYLN	163	DASNLET	176	QQYDNLPLT	189
CLL-1-CAR 13	RASQGISSALA	168	DASSLES	181	QQFNYPPLT	194

181268	RASQSVSSSYLA	202	GASSRAT	203	QQYGSSPLT	204
--------	--------------	-----	---------	-----	-----------	-----

Таблица 5. CDR переменных доменов тяжелой цепи согласно схеме нумерации Кабата (Kabat et al. (1991), «Sequences of Proteins of Immunological Interest», 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)

5

10

15

20

25

Кандидат	HCDR1	ID	HCDR2	ID	HCDR3	ID
146259-CLL-1-CAR9	DHVMH	322	YIHAANGGTHYSQKFQD	336	GGYNSDAFDI	350
139119-CLL-1-CAR6	GYYSWS	319	EINHSGSTNYNPSLKS	333	GSGLVYAIRVGSGWFDY	347
146261-CLL-1-CAR10	SYSMN	323	YISSSSSTIYYADSVKG	337	DLSVRAIDAFDI	351
146262-CLL-1-CAR11	SYGLH	324	LIEYDGSNKYYGDSVKG	338	EGNEDLAFDI	352
146263-CLL-1-CAR12	SNYMT	325	VIYSGGATYYGDSVKG	339	DRLYCGNNCYLYYYGMDV	353
139115-CLL-1-CAR1	SYAIS	314	GIPIFGTANYAQKFQG	328	DLEMATIMGGY	342
139116-CLL-1-CAR2	DYAMH	315	LISGDGGSTYYADSVKG	329	VFDSYYMDV	343
139118-CLL-1-CAR3	SSSYWYG	316	SIYYSGSTYYNPSLKS	330	PGTYDFLSGYYPFY	344
139122-CLL-1-CAR4	SYWMS	317	NINEDGSAKFYVDSVKG	331	DLRSGRY	345
139117-CLL-1-CAR5	SGSHYWN	318	YIYSGSTNYNPSLEN	332	GTATFDWNFPFDS	346
139120-CLL-1-CAR7	SYSMN	320	SISSSSYIYYADSVKG	334	DPSSSGSYMEDSYYYGMDV	348
139121-CLL-1-CAR8	SYEMN	321	YISSSGSTIYYADSVKG	335	EALGSSWE	349
146264-CLL-1-CAR13	GYIYQ	326	WIDPNSGNTGYAQKFQG	340	DSYGYYYGMDV	354
181268	SYEMN	327	YISSSGSTIYYADSVKG	341	DPYSSSWHDAFDI	355

Таблица 6. CDR переменных доменов легкой цепи согласно схеме нумерации Кабата (Kabat et al. (1991), «Sequences of Proteins of Immunological Interest», 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)

30

35

40

45

Кандидат	LCDR1	ID	LCDR2	ID	LCDR3	ID
146259-CLL-1-CAR9	RASQDISSWLA	364	AASSLQS	378	QQSYSTPLT	392
139119-CLL-1-CAR6	RASQSISSYLN	361	AASSLQS	375	QQSYSTPPWT	389
146261-CLL-1-CAR10	QASQDISNYLN	365	DASNLET	379	QQAYSTPFT	393
146262-CLL-1-CAR11	QASQFIKKNLN	366	DASSLQT	380	QQHDNLPLT	394
146263-CLL-1-CAR12	RASQSISSYLN	367	AASSLQS	381	QQSYSTPPLT	395
139115-CLL-1-CAR1	TGTSSDVGGYNYVS	356	DVSNRPS	370	SSYTSSSTLDVV	384
139116-CLL-1-CAR2	RSSQSLVYTDGNTYLN	357	KVSNRDS	371	MQGTHWSFT	385
139118-CLL-1-CAR3	RASQGISSYLA	358	AASTLQS	372	QQLNSYPYT	386
139122-CLL-1-CAR4	RASQSISGSFLA	359	GASSRAT	373	QQYGSSPPT	387
139117-CLL-1-CAR5	RASQSISSYLN	360	AASSLQS	374	QQSYSTPWT	388
139120-CLL-1-CAR7	TGSSGSIASNYVQ	362	EDNQRP	376	QSYDSSNQVV	390
139121-CLL-1-CAR8	QASQDISNYLN	363	DASNLET	377	QQYDNLPLT	391
146264-	RASQGISSALA	368	DASSLES	382	QQFNYYPLT	396

CLL-1-CAR13						
181268	RASQSVSSSYLA	369	GASSRAT	383	QQYGSSPLT	397

Таблица 7. CDR вариабельных доменов тяжелой цепи согласно схеме нумерации Чотиа (Al-Lazikani et al., (1997), JMB 273, 927-948)

5

10

15

20

25

Кандидат	HCDR1	ID	HCDR2	ID	HCDR3	ID
146259-CLL-1-CAR9	ANTFSDH	406	HAANGG	420	GGYNDAFDI	434
139119-CLL-1-CAR6	GGSFSGY	403	NHSGS	417	GSGLVVYAIRVGSWFDY	431
146261-CLL-1-CAR10	GFTFSSY	407	SSSSST	421	DLSVRAIDAFDI	435
146262-CLL-1-CAR11	GFTFNSY	408	EYDGSN	422	EGNEDLAFDI	436
146263-CLL-1-CAR12	GFNVSSN	409	YSGGA	423	DRLYCGNNCYLYYYGMDV	437
139115-CLL-1-CAR1	GGTFSSY	398	IPIFGT	412	DLEMATIMGGY	426
139116-CLL-1-CAR2	GFTFDDY	399	SGDGGS	413	VFDSYYMDV	427
139118-CLL-1-CAR3	GGSISSSY	400	YYS GS	414	PGTYYDFLSGYYPFY	428
139122-CLL-1-CAR4	GFTFSSY	401	NEDGSA	415	DLRSGRY	429
139117-CLL-1-CAR5	GGPVRSGSH	402	YYS GS	416	GTATFDWNFPFDS	430
139120-CLL-1-CAR7	GFTFSSY	404	SSSSSY	418	DPSSSGSYYMEDSYYYGMDV	432
139121-CLL-1-CAR8	GFTFSSY	405	SSSGST	419	EALGSSWE	433
146264-CLL-1-CAR13	GYPFTGY	410	DPNSGN	424	DSYGYYYGMDV	438
181268	GFTFSSY	411	SSSGST	425	DPYSSSWHDAFDI	439

Таблица 8. CDR вариабельных доменов легкой цепи согласно схеме нумерации Чотиа (Al-Lazikani et al., (1997), JMB 273, 927-948)

30

35

40

45

Кандидат	LCDR1	ID	LCDR2	ID	LCDR3	ID
146259-CLL-1-CAR9	SQDISSW	448	AAS	462	SYSTPL	476
139119-CLL-1-CAR6	SQSISSY	445	AAS	459	SYSTPPW	473
146261-CLL-1-CAR10	SQDISNY	449	DAS	463	AYSTPF	477
146262-CLL-1-CAR11	SQFIKKN	450	DAS	464	HDNLPL	478
146263-CLL-1-CAR12	SQSISSY	451	AAS	465	SYSTPPL	479
139115-CLL-1-CAR1	TSSDVGGYNY	440	DVS	454	YTSSSTLDV	468
139116-CLL-1-CAR2	SQSLVYTDGNTY	441	KVS	455	GTHWSF	469
139118-CLL-1-CAR3	SQGISSY	442	AAS	456	LNSYPY	470
139122-CLL-1-CAR4	SQSISGSF	443	GAS	457	YGSSPP	471
139117-CLL-1-CAR5	SQSISSY	444	AAS	458	SYSTPW	472
139120-CLL-1-CAR7	SSGSIASNY	446	EDN	460	YDSSNQV	474
139121-CLL-1-CAR8	SQDISNY	447	DAS	461	YDNLPL	475
146264-CLL-1-CAR13	SQGISSA	452	DAS	466	FNNYPL	480
181268	SQSVSSSY	453	GAS	467	YGSSPL	481

В некоторых воплощениях молекула CAR, описанного в настоящем описании (например, CAR нуклеиновой кислоты или CAR полипептида), включает

(1) один, два или три CDR легкой цепи (LC), выбранных из следующих:

(i) LC CDR1 SEQ ID NO: 156, LC CDR2 SEQ ID NO: 169 и LC CDR3 SEQ ID NO: 182

5 CLL-1-CAR-1;

(ii) LC CDR1 SEQ ID NO: 157, LC CDR2 SEQ ID NO: 170 и LC CDR3 SEQ ID NO: 183
CLL-1-CAR-2;

(iii) LC CDR1 SEQ ID NO: 158, LC CDR2 SEQ ID NO: 171 и LC CDR3 SEQ ID NO: 184
CLL-1-CAR-3;

10 (iv) LC CDR1 SEQ ID NO: 159, LC CDR2 SEQ ID NO: 172 и LC CDR3 SEQ ID NO: 185
CLL-1-CAR-4;

(v) LC CDR1 SEQ ID NO: 160, LC CDR2 SEQ ID NO: 173 и LC CDR3 SEQ ID NO: 186
CLL-1-CAR-5;

(vi) LC CDR1 SEQ ID NO: 161, LC CDR2 SEQ ID NO: 174 и LC CDR3 SEQ ID NO: 187
15 CLL-1-CAR-6;

(vii) LC CDR1 SEQ ID NO: 162, LC CDR2 SEQ ID NO: 175 и LC CDR3 SEQ ID NO: 188
CLL-1-CAR-7;

(viii) LC CDR1 SEQ ID NO: 163, LC CDR2 SEQ ID NO: 176 и LC CDR3 SEQ ID NO: 189
CLL-1-CAR-8; или

20 (ix) LC CDR1 SEQ ID NO: 164, LC CDR2 SEQ ID NO: 177 и LC CDR3 SEQ ID NO: 190
CLL-1-CAR-9;

(x) LC CDR1 SEQ ID NO: 165, LC CDR2 SEQ ID NO: 178 и LC CDR3 SEQ ID NO: 191
CLL-1-CAR-10;

(xi) LC CDR1 SEQ ID NO: 166, LC CDR2 SEQ ID NO: 179 и LC CDR3 SEQ ID NO: 192
25 CLL-1-CAR-11;

(xii) LC CDR1 SEQ ID NO: 167, LC CDR2 SEQ ID NO: 180 и LC CDR3 SEQ ID NO: 193
CLL-1-CAR-12;

(xiii) LC CDR1 SEQ ID NO: 168, LC CDR2 SEQ ID NO: 181 и LC CDR3 SEQ ID NO: 194
CLL-1-CAR-13;

30 (xiv) LC CDR1 SEQ ID NO: 202, LC CDR2 SEQ ID NO: 203 и LC CDR3 SEQ ID NO: 204
181286; и/или

(2) один, два или три CDR тяжелой цепи (HC) одного из следующих:

(i) HC CDR1 SEQ ID NO: 117, HC CDR2 SEQ ID NO: 130 и HC CDR3 SEQ ID NO: 143
CLL-1-CAR-1;

35 (ii) HC CDR1 SEQ ID NO: 118, HC CDR2 SEQ ID NO: 131 и HC CDR3 SEQ ID NO: 144
CLL-1-CAR-2;

(iii) HC CDR1 SEQ ID NO: 119, HC CDR2 SEQ ID NO: 132 и HC CDR3 SEQ ID NO: 145
CLL-1-CAR-3;

(iv) HC CDR1 SEQ ID NO: 120, HC CDR2 SEQ ID NO: 133 и HC CDR3 SEQ ID NO: 146
40 CLL-1-CAR-4;

(v) HC CDR1 SEQ ID NO: 121, HC CDR2 SEQ ID NO: 134 и HC CDR3 SEQ ID NO: 147
CLL-1-CAR-5;

(vi) HC CDR1 SEQ ID NO: 122, HC CDR2 SEQ ID NO: 135 и HC CDR3 SEQ ID NO: 148
CLL-1-CAR-6;

45 (vii) HC CDR1 SEQ ID NO: 123, HC CDR2 SEQ ID NO: 136 и HC CDR3 SEQ ID NO: 149
CLL-1-CAR-7;

(viii) HC CDR1 SEQ ID NO: 124, HC CDR2 SEQ ID NO: 137 и HC CDR3 SEQ ID NO: 150
CLL-1-CAR-8; или

(ix) HC CDR1 SEQ ID NO: 125, HC CDR2 SEQ ID NO: 138 и HC CDR3 SEQ ID NO: 151 CLL-1-CAR-9;

(x) HC CDR1 SEQ ID NO: 126, HC CDR2 SEQ ID NO: 139 и HC CDR3 SEQ ID NO: 152 CLL-1-CAR-10;

5 (xi) HC CDR1 SEQ ID NO: 127, HC CDR2 SEQ ID NO: 140 и HC CDR3 SEQ ID NO: 153 CLL-1-CAR-11;

(xii) HC CDR1 SEQ ID NO: 128, HC CDR2 SEQ ID NO: 141 и HC CDR3 SEQ ID NO: 154 CLL-1-CAR-12;

10 (xiii) HC CDR1 SEQ ID NO: 129, HC CDR2 SEQ ID NO: 142 и HC CDR3 SEQ ID NO: 155 CLL-1-CAR-13;

(xiv) HC CDR1 SEQ ID NO: 199, HC CDR2 SEQ ID NO: 200 и HC CDR3 SEQ ID NO: 201 181286.

15 В некоторых воплощениях молекула CAR, описанного в настоящем описании (например, CAR нуклеиновой кислоты или CAR полипептида), или CLL-1-связывающий домен включают

(1) один, два или три CDR легкой цепи (LC), выбранных из следующих:

(i) LC CDR1 SEQ ID NO: 356, LC CDR2 SEQ ID NO: 370 и LC CDR3 SEQ ID NO: 384 CLL-1-CAR-1;

20 (ii) LC CDR1 SEQ ID NO: 357, LC CDR2 SEQ ID NO: 371 и LC CDR3 SEQ ID NO: 385 CLL-1-CAR-2;

(iii) LC CDR1 SEQ ID NO: 358, LC CDR2 SEQ ID NO: 372 и LC CDR3 SEQ ID NO: 386 CLL-1-CAR-3;

(iv) LC CDR1 SEQ ID NO: 359, LC CDR2 SEQ ID NO: 373 и LC CDR3 SEQ ID NO: 387 CLL-1-CAR-4;

25 (v) LC CDR1 SEQ ID NO: 360, LC CDR2 SEQ ID NO: 374 и LC CDR3 SEQ ID NO: 388 CLL-1-CAR-5;

(vi) LC CDR1 SEQ ID NO: 361, LC CDR2 SEQ ID NO: 375 и LC CDR3 SEQ ID NO: 389 CLL-1-CAR-6;

30 (vii) LC CDR1 SEQ ID NO: 362, LC CDR2 SEQ ID NO: 376 и LC CDR3 SEQ ID NO: 390 CLL-1-CAR-7;

(viii) LC CDR1 SEQ ID NO: 363, LC CDR2 SEQ ID NO: 377 и LC CDR3 SEQ ID NO: 391 CLL-1-CAR-8; или

(ix) LC CDR1 SEQ ID NO: 364, LC CDR2 SEQ ID NO: 378 и LC CDR3 SEQ ID NO: 392 CLL-1-CAR-9;

35 (x) LC CDR1 SEQ ID NO: 365, LC CDR2 SEQ ID NO: 379 и LC CDR3 SEQ ID NO: 393 CLL-1-CAR-10;

(xi) LC CDR1 SEQ ID NO: 366, LC CDR2 SEQ ID NO: 380 и LC CDR3 SEQ ID NO: 394 CLL-1-CAR-11;

40 (xii) LC CDR1 SEQ ID NO: 367, LC CDR2 SEQ ID NO: 381 и LC CDR3 SEQ ID NO: 395 CLL-1-CAR-12;

(xiii) LC CDR1 SEQ ID NO: 368, LC CDR2 SEQ ID NO: 382 и LC CDR3 SEQ ID NO: 396 CLL-1-CAR-13;

(xiv) LC CDR1 SEQ ID NO: 369, LC CDR2 SEQ ID NO: 383 и LC CDR3 SEQ ID NO: 397 181286; и/или

45 (2) один, два или три CDR тяжелой цепи (HC) одного из следующих:

(i) HC CDR1 SEQ ID NO: 314, HC CDR2 SEQ ID NO: 328 и HC CDR3 SEQ ID NO: 342 CLL-1-CAR-1;

(ii) HC CDR1 SEQ ID NO: 315, HC CDR2 SEQ ID NO: 329 и HC CDR3 SEQ ID NO: 343

CLL-1-CAR-2;

(iii) HC CDR1 SEQ ID NO: 316, HC CDR2 SEQ ID NO: 330 и HC CDR3 SEQ ID NO: 344
CLL-1-CAR-3;

(iv) HC CDR1 SEQ ID NO: 317, HC CDR2 SEQ ID NO: 331 и HC CDR3 SEQ ID NO: 345
CLL-1-CAR-4;

(v) HC CDR1 SEQ ID NO: 318, HC CDR2 SEQ ID NO: 332 и HC CDR3 SEQ ID NO: 346
CLL-1-CAR-5;

(vi) HC CDR1 SEQ ID NO: 319, HC CDR2 SEQ ID NO: 333 и HC CDR3 SEQ ID NO: 347
CLL-1-CAR-6;

(vii) HC CDR1 SEQ ID NO: 320, HC CDR2 SEQ ID NO: 334 и HC CDR3 SEQ ID NO: 348
CLL-1-CAR-7;

(viii) HC CDR1 SEQ ID NO: 321, HC CDR2 SEQ ID NO: 335 и HC CDR3 SEQ ID NO: 349
CLL-1-CAR-8; или

(ix) HC CDR1 SEQ ID NO: 322, HC CDR2 SEQ ID NO: 336 и HC CDR3 SEQ ID NO: 350
CLL-1-CAR-9;

(x) HC CDR1 SEQ ID NO: 323, HC CDR2 SEQ ID NO: 337 и HC CDR3 SEQ ID NO: 351
CLL-1-CAR-10;

(xi) HC CDR1 SEQ ID NO: 324, HC CDR2 SEQ ID NO: 338 и HC CDR3 SEQ ID NO: 352
CLL-1-CAR-11;

(xii) HC CDR1 SEQ ID NO: 325, HC CDR2 SEQ ID NO: 339 и HC CDR3 SEQ ID NO: 353
CLL-1-CAR-12;

(xiii) HC CDR1 SEQ ID NO: 326, HC CDR2 SEQ ID NO: 340 и HC CDR3 SEQ ID NO: 354
CLL-1-CAR-13;

(xiv) HC CDR1 SEQ ID NO: 327, HC CDR2 SEQ ID NO: 341 и HC CDR3 SEQ ID NO: 355
181286.

В некоторых воплощениях молекула CAR, описанного в настоящем описании (например, CAR нуклеиновой кислоты или CAR полипептида), включает

(1) один, два или три CDR легкой цепи (LC), выбранных из следующих:

(i) LC CDR1 SEQ ID NO: 440, LC CDR2 SEQ ID NO: 454 и LC CDR3 SEQ ID NO: 468
CLL-1-CAR-1;

(ii) LC CDR1 SEQ ID NO: 441, LC CDR2 SEQ ID NO: 455 и LC CDR3 SEQ ID NO: 469
CLL-1-CAR-2;

(iii) LC CDR1 SEQ ID NO: 442, LC CDR2 SEQ ID NO: 456 и LC CDR3 SEQ ID NO: 470
CLL-1-CAR-3;

(iv) LC CDR1 SEQ ID NO: 443, LC CDR2 SEQ ID NO: 457 и LC CDR3 SEQ ID NO: 471
CLL-1-CAR-4;

(v) LC CDR1 SEQ ID NO: 444, LC CDR2 SEQ ID NO: 458 и LC CDR3 SEQ ID NO: 472
CLL-1-CAR-5;

(vi) LC CDR1 SEQ ID NO: 445, LC CDR2 SEQ ID NO: 459 и LC CDR3 SEQ ID NO: 473
CLL-1-CAR-6;

(vii) LC CDR1 SEQ ID NO: 446, LC CDR2 SEQ ID NO: 460 и LC CDR3 SEQ ID NO: 474
CLL-1-CAR-7;

(viii) LC CDR1 SEQ ID NO: 447, LC CDR2 SEQ ID NO: 461 и LC CDR3 SEQ ID NO: 475
CLL-1-CAR-8; или

(ix) LC CDR1 SEQ ID NO: 448, LC CDR2 SEQ ID NO: 462 и LC CDR3 SEQ ID NO: 476
CLL-1-CAR-9;

(x) LC CDR1 SEQ ID NO: 449, LC CDR2 SEQ ID NO: 463 и LC CDR3 SEQ ID NO: 477
CLL-1-CAR-10;

(xi) LC CDR1 SEQ ID NO: 450, LC CDR2 SEQ ID NO: 464 и LC CDR3 SEQ ID NO: 478 CLL-1-CAR-11;

(xii) LC CDR1 SEQ ID NO: 451, LC CDR2 SEQ ID NO: 465 и LC CDR3 SEQ ID NO: 479 CLL-1-CAR-12;

5 (xiii) LC CDR1 SEQ ID NO: 452, LC CDR2 SEQ ID NO: 466 и LC CDR3 SEQ ID NO: 480 CLL-1-CAR-13;

(xiv) LC CDR1 SEQ ID NO: 453, LC CDR2 SEQ ID NO: 467 и LC CDR3 SEQ ID NO: 481 181286; и/или

(2) один, два или три CDR тяжелой цепи (HC) из следующих:

10 (i) HC CDR1 SEQ ID NO: 398, HC CDR2 SEQ ID NO: 412 и HC CDR3 SEQ ID NO: 426 CLL-1-CAR-1;

(ii) HC CDR1 SEQ ID NO: 399, HC CDR2 SEQ ID NO: 413 и HC CDR3 SEQ ID NO: 427 CLL-1-CAR-2;

15 (iii) HC CDR1 SEQ ID NO: 400, HC CDR2 SEQ ID NO: 414 и HC CDR3 SEQ ID NO: 428 CLL-1-CAR-3;

(iv) HC CDR1 SEQ ID NO: 401, HC CDR2 SEQ ID NO: 415 и HC CDR3 SEQ ID NO: 429 CLL-1-CAR-4;

(v) HC CDR1 SEQ ID NO: 402, HC CDR2 SEQ ID NO: 416 и HC CDR3 SEQ ID NO: 430 CLL-1-CAR-5;

20 (vi) HC CDR1 SEQ ID NO: 403, HC CDR2 SEQ ID NO: 417 и HC CDR3 SEQ ID NO: 431 CLL-1-CAR-6;

(vii) HC CDR1 SEQ ID NO: 404, HC CDR2 SEQ ID NO: 418 и HC CDR3 SEQ ID NO: 432 CLL-1-CAR-7;

25 (viii) HC CDR1 SEQ ID NO: 405, HC CDR2 SEQ ID NO: 419 и HC CDR3 SEQ ID NO: 433 CLL-1-CAR-8; или

(ix) HC CDR1 SEQ ID NO: 406, HC CDR2 SEQ ID NO: 420 и HC CDR3 SEQ ID NO: 434 CLL-1-CAR-9;

(x) HC CDR1 SEQ ID NO: 407, HC CDR2 SEQ ID NO: 421 и HC CDR3 SEQ ID NO: 435 CLL-1-CAR-10;

30 (xi) HC CDR1 SEQ ID NO: 408, HC CDR2 SEQ ID NO: 422 и HC CDR3 SEQ ID NO: 436 CLL-1-CAR-11;

(xii) HC CDR1 SEQ ID NO: 409, HC CDR2 SEQ ID NO: 423 и HC CDR3 SEQ ID NO: 437 CLL-1-CAR-12;

35 (xiii) HC CDR1 SEQ ID NO: 410, HC CDR2 SEQ ID NO: 424 и HC CDR3 SEQ ID NO: 438 CLL-1-CAR-13;

(xiv) HC CDR1 SEQ ID NO: 411, HC CDR2 SEQ ID NO: 425 и HC CDR3 SEQ ID NO: 439 181286.

В воплощениях анти-CLL-1 полностью человеческие одноцепочечные переменные фрагменты генерируют и клонируют в лентивирусные CAR-экспрессирующие векторы с внутриклеточным доменом CD3-дзета и внутриклеточным костимулирующим доменом 4-1BB. В таблице 1 приводятся названия примеров полностью человеческих CLL-1 scFv.

Таблица 1. Конструкции CAR-CLL-1

Конструкции ID	Название
139115	CLL-1 (или CLL-1-CAR-1)
139116	CLL-2 (или CLL-1-CAR-2)
139117	CLL-3 (или CLL-1-CAR-3)
139118	CLL-4 (или CLL-1-CAR-4)
139119	CLL-5 (или CLL-1-CAR-5)

139120	CLL-6 (или CLL-1-CAR-6)
139121	CLL-7 (или CLL-1-CAR-7)
139122	CLL-8 (или CLL-1-CAR-8)
146259	CLL-9 (или CLL-1-CAR-9)
146261	CLL-10 (или CLL-1-CAR-10)
146262	CLL-11 (или CLL-1-CAR-11)
146263	CLL-12 (или CLL-1-CAR-12)
146264	CLL-13 (или CLL-1-CAR-13)

В воплощениях порядок, в котором домены VL и VH появляются в scFv, изменяется (т.е., ориентация VL-VH или VH-VL), и где или три или четыре копии субъединицы «G4S» (SEQ ID NO: 25), в которых каждая субъединица включает последовательность GGGGS (SEQ ID NO: 25) (например, (G4S)₃ (SEQ ID NO: 28) или (G4S)₄ (SEQ ID NO: 27)), соединяют переменные домены для создания полного домена scFv, как показано в таблице 2.

Аминокислотные и нуклеотидные последовательности CLL-1-scFv доменов и молекул CLL-1-CAR приводятся в таблице 2. Аминокислотные последовательности переменной тяжелой цепи и переменной легкой цепи для каждого scFv также приводятся в таблице 2. Отмечается, что фрагменты scFv (SEQ ID NO: 39-51) с лидерной последовательностью (например, аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 12) также охватываются настоящим изобретением.

Лидерная (аминокислотная последовательность) SEQ ID NO: 1

MALPVTALLPLALLHAARP

Лидерная (nucleic acid sequence) (SEQ ID NO: 12)

ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCATGCCG
CTAGACCC

Шарнирный CD8 (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 2)

TTTPAPRPPTPARTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

Шарнирный CD8 (нуклеотидная последовательность) (SEQ ID NO: 13)

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCAACCATCGCGTCGCAG
CCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACAC
GAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGA

Трансмембранный CD8 (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 6)

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC

Трансмембранный CD8 (нуклеотидная последовательность) (SEQ ID NO: 17)

ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGT
TATCACCCCTTACTGC

Внутриклеточный домен 4-1BB (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 7)

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

Внутриклеточный домен 4-1BB (нуклеотидная последовательность) (SEQ ID NO: 18)

AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATCAACAACCATTTATGAGACCA
GTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGA
AGGAGGATGTGAACTG

Внутриклеточный домен CD28 (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 482)

RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 482)

Внутриклеточный домен CD28 (нуклеотидная последовательность) (SEQ ID NO: 483)

AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGC
CGCCCCGGGGCCACCCGCAAGCATACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGC

AGCCTATCGCTCC (SEQ ID NO: 483)

Внутриклеточный домен ICOS (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 484)

Т К К К Y S S S V H D P N G E Y M F M R A V N T A K K S R L T D V T L (SEQ ID NO: 484)

Внутриклеточный домен ICOS (нуклеотидная последовательность) (SEQ ID NO: 485)

А С А А А А А А А G A A G T A T T C A T C C A G T G T G C A C G A C C C T A A C G G T G A A T A C A T G T T C
A T G A G A G C A G T G A A C A C A G C C A A A A A T C C A G A C T C A C A G A T G T G A C C C T A (SEQ
ID NO: 485)

Домен CD3-дзета (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO: 9)

R V K F S R S A D A P A Y K Q G Q N Q L Y N E L N L G R R E E Y D V L D K R R G R D P E M G G K P R R K N P Q
E G L Y N E L Q K D K M A E A Y S E I G M K G E R R R G K G H D G L Y Q G L S T A T K D T Y D A L H M Q A L P P R

CD3-дзета (нуклеотидная последовательность) (SEQ ID NO: 20)

A G A G T G A A G T T C A G C A G G A G C G C A G A C G C C C C C G C G T A C A A G C A G G G C C A G A A
C C A G C T C T A T A A C G A G C T C A A T C T A G G A C G A A G A G A G G A G T A C G A T G T T T T G G A C A
A G A G A C G T G G C C G G G A C C C T G A G A T G G G G G G A A A G C C G A G A A G G A A G A A C C C T C A
G G A A G G C C T G T A C A A T G A A C T G C A G A A A G A T A A G A T G G C G G A G G C C T A C A G T G A G
A T T G G G A T G A A A G G C G A G C G C C G G A G G G G C A A G G G G C A C G A T G G C C T T T A C C A G G
G T C T C A G T A C A G C C A C C A A G G A C A C C T A C G A C G C C C T T C A C A T G C A G G C C C T G C C C
C C T C G C

Домен CD3-дзета (аминокислотная последовательность; эталонная последовательность NCBI NM_000734.3) (SEQ ID NO:10)

R V K F S R S A D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N L G R R E E Y D V L D K R R G R D P E M G G K P R R K N P Q
E G L Y N E L Q K D K M A E A Y S E I G M K G E R R R G K G H D G L Y Q G L S T A T K D T Y D A L H M Q A L P P R

CD3-дзета (нуклеотидная последовательность; эталонная последовательность NCBI NM_000734.3); (SEQ ID NO:21)

a g a g t g a a g t t c a g c a g g a g c g c a g a c g c c c c c g c g t a c c a g c a g g g c c a g
a a c c a g c t c t a t a a c g a g c t c a a t c t a g g a c g a a g a g a g g a g t a c g a t g t t t
t g g a c a a g a g a c g t g c c c g g g a c c c t g a g a t g g g g g g a a a g c c g a g a a g g a
a g a a c c c t c a g g a a g g c c t g t a c a a t g a a c t g c a g a a g a t a a g a t g g c g g
a g g c c t a c a g t g a g a t t g g g a t g a a a g g c g a g c g c c g g a g g g g c a a g g g g c
a c g a t g g c c t t t a c c a g g t c t c a g t a c a g c c a c c a a g g a c a c c t a c g a c g c
c c t c a c a t g c a g g c c c t g c c c c c t c g c

Шарнирный IgG4 (аминокислотная последовательность) (SEQ ID NO:36)

E S K Y G P P C P P C P A P E F L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N
W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E
K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K
T T P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S L G K M

Шарнирный IgG4 (нуклеотидная последовательность) (SEQ ID NO:37)

G A G A G C A A G T A C G G C C C T C C C T G C C C C C C T T G C C C T G C C C C C G A G T T C C T G G G C G
G A C C C A G C G T G T T C C T G T T C C C C C C A A G C C C A A G G A C A C C C T G A T G A T C A G C C G G
A C C C C C G A G G T G A C C T G T G T G G T G G T G G A C G T G T C C C A G G A G G A C C C C G A G G T C C A
G T T C A A C T G G T A C G T G G A C G G C G T G G A G G T G C A C A C G C C A A G A C C A A G C C C C G G G
A G G A G C A G T T C A A T A G C A C C T A C C G G G T G G T G T C C G T G C T G A C C G T G C T G C A C C A G
G A C T G G C T G A A C G G C A A G G A A T A C A A G T G T A A G G T G T C C A A C A A G G G C C T G C C C A G
C A G C A T C G A G A A A A C C A T C A G C A A G G C C A A G G G C C A G C C T C G G G A G C C C C A G G T G
T A C A C C C T G C C C C C T A G C C A A G A G G A G A T G A C C A A G A A C C A G G T G T C C C T G A C C T G
C C T G G T G A A G G G C T T C T A C C C C A G C G A C A T C G C C G T G G A G T G G G A G A G C A A C G G C C

AGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTC
TTCCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTCTT
TAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGA
GCCTGTCCCTGGGCAAGATG

5 В воплощениях такие клоны (например, в таблице 2) все содержат изменение остатка Q/K в сигнальном домене костимулирующего домена, полученного из цепи CD3-дзета.

Таблица 2. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности CLL-1-scFv доменов и молекул CLL-1-CAR

10	Название/ Описание	SEQ ID NO:	Последовательность
			146259
	146259- ак, ScFv-домен CLL-1-CAR 9	47	QVQLVQSGAEVKEPGASVKVSKAPANTFSDHVMHWVRQAPGQRFQFEWMGYIHAANGGTHYS QKFQDRVTITRDT SANTVYMDLSSLRSEDTAVYYCARGGYNSDAFDIWQGQTMVTVSSGGGGGS GGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQDISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFNGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGKVEIK
15	146259- нк, ScFv-домен CLL-1-CAR 9	60	CAAGTGCAACTCGTCCAGTCCGGTGCAGAAGTCAAGGAACCCGGAGCCTCCGTGAAAGTGT CCTGCAAAGCTCCTGCCAACACTTTCTCGGACCACGTGATGCACTGGGTGCGCCAGGCGCC GGGCCAGCGCTTCGAATGGATGGGATACATTCATGCCGCCAATGGCGGTACCCACTACTCC CAAAAGTTCCAGGATAGAGTACCATACCCGGGACACCAGCGCCAACACCGTGTATATGG ATCTGTCCAGCCTGAGGTCCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGGGCGGATACAA CTCAGACGCGTTCGACATTTGGGGACAGGGTACTATGGTCACCGTGTATCCGGGGGCGGT GGCAGCGGGGGCGGAGGCTCTGGCGGAGGCGGATCAGGGGGAGGAGGTCCGACATCGTG ATGACCCAGTCCCGTTCATCGGTGTCCGCGTCCGTGGGAGACAGAGTGACCATCAGGTGTCG CGCCAGCCAGGACATCTCCTCGTGGTGGCATGGTACCAGCAGAAGCCTGGAAGGCCCGG AAGCTGCTCATCTACGCCGCTCCTCCCTTCAATCGGGAGTGCCCTCGCGGTTCAACGGAAG CGGAAGCGGGACAGATTTACCCTGACTATTAGCTCGCTGCAGCCCGAGGACTTCGCTACTT ACTACTGCCAACAGAGCTACTCCACCCCACTGACTTTCGGCGGGGTACCAAGGTCGAGAT CAAG
20	146259- ак, VH ScFv CLL-1-CAR 9	73	QVQLVQSGAEVKEPGASVKVSKAPANTFSDHVMHWVRQAPGQRFQFEWMGYIHAANGGTHYS QKFQDRVTITRDT SANTVYMDLSSLRSEDTAVYYCARGGYNSDAFDIWQGQTMVTVSS
25	146259- ак, VL ScFv CLL-1-CAR 9	86	DIVMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQDISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFNGS GSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGKVEIK
30	146259- ак, полный CAR, CLL-1-CAR 9	99	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKEPGASVKVSKAPANTFSDHVMHWVRQAP GQRFQFEWMGYIHAANGGTHYSQKFQDRVTITRDT SANTVYMDLSSLRSEDTAVYYCARGGYNS DAFDIWQGQTMVTVSSGGGGSGGGSDIVMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQ DISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFNGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQSY STPLTFGGGKVEIKTTTPAPRPPTPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWP LAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPFEEEEEGGCELRVKFS RSADAPAYKQQNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPMEGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
35	146259- нк, полный CAR, CLL-1-CAR 9	112	ATGGCCCTCCCTGTACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGTCCACGCCGCTCGGGCC CAAGTGCAACTCGTCCAGTCCGGTGCAGAAGTCAAGGAACCCGGAGCCTCCGTGAAAGTGT CCTGCAAAGCTCCTGCCAACACTTTCTCGGACCACGTGATGCACTGGGTGCGCCAGGCGCC GGGCCAGCGCTTCGAATGGATGGGATACATTCATGCCGCCAATGGCGGTACCCACTACTCC CAAAAGTTCCAGGATAGAGTACCATACCCGGGACACCAGCGCCAACACCGTGTATATGG ATCTGTCCAGCCTGAGGTCCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGGGCGGATACAA CTCAGACGCGTTCGACATTTGGGGACAGGGTACTATGGTCACCGTGTATCCGGGGGCGGT GGCAGCGGGGGCGGAGGCTCTGGCGGAGGCGGATCAGGGGGAGGAGGTCCGACATCGTG ATGACCCAGTCCCGTTCATCGGTGTCCGCGTCCGTGGGAGACAGAGTGACCATCAGGTGTCG CGCCAGCCAGGACATCTCCTCGTGGTGGCATGGTACCAGCAGAAGCTCGGAAGGCCCGCC AAGCTGCTCATCTACGCCGCTCCTCCCTTCAATCGGGAGTGCCCTCGCGGTTCAACGGAAG CGGAAGCGGGACAGATTTACCCTGACTATTAGCTCGCTGCAGCCCGAGGACTTCGCTACTT ACTACTGCCAACAGAGCTACTCCACCCCACTGACTTTCGGCGGGGTACCAAGGTCGAGAT CAAGACCACTACCCAGCAGCCAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCTCCAGCCTC TGTCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGCAGCTGGTGGGGCGGTGCATACCCGGGGTCTT GACTTCGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCTGCTGCTT TCACTCGTGATCACTCTTACTGTAAGCGCGGTGCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTAAAGCA ACCTTTCATGAGGCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCCGGTTCCTCA GAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAAGTGCAGCTGAATTCAGCCGACGCGCAGATGCTCCA GCCTACAAGCAGGGGACAGACAGCTCTACAACGAAGTCAATCTTGGTGGAGAGAGGAG TACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGA AAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAAGCCTAT AGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAAGAGGCAAGGCCACGACGAGTGTACCAG GGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGACAGGCCCTGCCGCTC GG
40			139119
45	139119- ак, ScFv-домен CLL-1-CAR 6	44	QVQLQESGAGLLKPSETLSLTCVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWVGEINHSNSTYNPSLK SRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGSGLVVYAIRVGSWGFYDWGQGLTVTVSSG GGSGGGSDGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLMYA ASSLQSGVPSRFSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQSYSTPPWTFGGGKVDIK

5	139119- нк, ScFv-домен CLL-1-CAR 6	57	CAAGTGCAACTTCAAGAATCAGGCGCAGGACTTCTCAAGCCATCCGAAACACTCTCCCTCA CTTGCGCGGTGTACGGGGGAAGCTTCTCGGGATACTACTGGTCTCTGGATTAGGCAGCCTCCC GGCAAAGGCCTGGAATGGGTGCGGGAGATCAACCACTCCGGTTCAACCAACTACAACCCG TCGCTGAAGTCCCGCGTGACCATTTCCGTGGACACCTCTAAGAATCAGTTTCAGCCTGAAGCT CTCGTCCGTGACCGCGCGGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTCGGGGATCAGGACTGGTG GTGTACGCCATCCGCGTGGGCTCGGGCTGGTTTCGATTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCA CTGTGTCTGTCGCGCGGAGGAGGTTTCGGGGGGCGGAGACAGCGGTGGAGGGGGTAGCGACA TCCAGATGACCCAGTCCCGTCTCGCTGTCCGCCTCCGTGGGAGATAGAGTGACCATCACC TGTCGGGCATCCCAGAGCATTTCCAGTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCCGAAAGG CCCCTAAGCTGTTGATGTACGCCGCCAGCAGCTTGCAGTCGGGCGTGCCGAGCCGGTTTCC GGTTCGGGCTCCGGGACTGACTTACCCTGACTATCTCATCCCTGCAACCCGAGGACTTCGC CACTTATTACTGCGCAGCAGTCTACTCAACCCCTCCCTGGACGTTTCGGACAGGGCACCAGG TCGATATCAAG
10	139119- ак, VH ScFv CLL-1-CAR 6	70	QVQLQESGAGLLKPSETLSLTCVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWVGEINHSGSTNYNPSLK SRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGSGLVVYAIRVSGWFDYWGQGLTVTVSS
	139119- ак, VL ScFv CLL-1-CAR 6	83	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLMYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPWTFGQGTKVDIK
15	139119- ак, полный CAR, CLL-1-CAR 6	96	MALPVTALLPLALLLHAARPQVQLQESGAGLLKPSETLSLTCVYGGSFSGYYWSWIRQPPGK GLEWVGEINHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGSGLVVYAIR VSGWFDYWGQGLTVTVSSGGGSGGSDIQQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSS SYLNWYQQKPGKAPKLLMYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP PWTFGQGTKVDIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAFLA GTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPFEEEGGCELRVKFSRS ADAPAYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNQPEGLYNELQDKDMA EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
20	139119- нк, полный CAR, CLL-1-CAR 6	109	ATGGCCCTCCCTGTACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGTCTCCACGCCGCTCGGCC CAAGTGCAACTTCAAGAATCAGGCGCAGGACTTCTCAAGCCATCCGAAACACTCTCCCTCA CTTGCGCGGTGTACGGGGGAAGCTTCTCGGGATACTACTGGTCTGGATTAGGCAGCCTCCC GGCAAAGGCCTGGAATGGGTGCGGGAGATCAACCACTCCGGTTCAACCAACTACAACCCG TCGCTGAAGTCCCGCGTGACCATTTCCGTGGACACCTCTAAGAATCAGTTTCAGCCTGAAGCT CTCGTCCGTGACCGCGCGGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTCGGGGATCAGGACTGGTG GTGTACGCCATCCGCGTGGGCTCGGGCTGGTTTCGATTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCA CTGTGTCTGTCGCGCGGAGGAGGTTTCGGGGGGCGGAGACAGCGGTGGAGGGGGTAGCGACA TCCAGATGACCCAGTCCCGTCTCGTGTCCGCCTCCGTGGGAGATAGAGTGACCATCACC TGTCGGGCATCCCAGAGCATTTCCAGTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCCGAAAGG CCCCTAAGCTGTTGATGTACGCCGCCAGCAGCTTGCAGTCGGGCGTGCCGAGCCGGTTTCC GGTTCGGGCTCCGGGACTGACTTACCCTGACTATCTCATCCCTGCAK,CCCAGGACTTCGC CACTTATTACTGCCAGCAGTCTCTACTCAACCCCTCCCTGGAGCTTCGACAGGACCAAGG TCGATATCAAGACCACTACCCAGACCGAGGCCACCCACCCGGCTCTACCATCGCTCC CAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGCAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCG GGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCCT GCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTACTGTAAGCGCGGTCCGGAAGAAGCTGTGTACATCT TTAAGCAACCCTTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCG GTTCACAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAAGTGCCTGGAATTCAGCCGACGCGCAGA TGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCGAACCAGCTCTACAACGAK,CTCAATCTTGTGTCGGAG AGAGGAGTACGACGTGTGGACAAGCGGAGAGGACGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGC CGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAG AAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAGAGGCAAGGCCACGACGGAC TGTACCAGGACTCAGACCCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGCCCT GCCGCTCGG
25			
30			
146261			
35	146261- ак, ScFv-домен CLL-1-CAR 10	48	QVQLVQSGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKLEWVSYISSSSSTIYYADSVK GRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLSVRAIDAFDIWQGMVTVSSGGGGSGGG GSGGGSGGGSDIVLTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASN L ETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQAYSTPFTFGPGTKVEIK
40	146261- нк, ScFv-домен CLL-1-CAR 10	61	CAAGTGCAACTTGTTCATCCGGTGAGGCTTGTGTCAGCCCGGAGGATCACTCAGACTGTC GTGCGCCGCTCTGGGTTCACTTTCTCCTCATACTCGATGAAGTGGGTGCGCCAGGCGCCGGG AAAGGGCCTGGAATGGGTGTATACATCTCCTCCTCATCTCCACCATCTACTACGCCGATTC CGTGAAGGGCCGCTTCACTATTTCCCGGACAACGCGAK,AAACTCGCTCTACTTGCAAATGA ACTCCCTGCGCGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGGACCTGAGCGTGCGGGCT ATTGATGCGTTCGACATCTGGGGACAGGGCACCATGTGCACAGTGTCCAGCGGAGGCGCGCG CAGCGGTGGAGGAGGATCAGGGGGAGGAGGTTTCGGGGGGCGGTGGCTCCGATATCGTGCTG ACCCAGAGCCCGTCGAGCCTCTCCGCTCCGTCCGCGCAGACAGTGACCATCACGTGTACGGC ATCCCAGGACATTAGCAACTACCTGAATTGGTACCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCACCCAAGT TGCTGATCTACGACGCCTCCAACCTGGAAACCGGAGTGCCATCCAGGTTCTCGGGCAGCGGC TCGGGAK,CCGACTTCACTTTTACTATCTCCTCCTGCAACCCGAGGATTTCGCGACCTACTAC TGCCAGCAGGCCTACAGCACCCCTTTCACCTTCGGGCGCGGGAAGTAAAGTCAAGTCAAG
45	146261- ак, VH ScFv CLL-1-CAR 10	74	QVQLVQSGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKLEWVSYISSSSSTIYYADSVK GRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLSVRAIDAFDIWQGMVTVSS
	146261- ак, VL ScFv CLL-1-CAR 10	87	DIVLTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDFATYYCQQAYSTPFTFGPGTKVEIK
	146261- ак, полный CAR, CLL-1-CAR 10	100	MALPVTALLPLALLLHAARPQVQLVQSGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGK GLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLSVRAIDAFD IWQGMVTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIVLTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDISNYL NWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQAYSTPFTFGP

		GTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLL LSIVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
146261- нк, полный CAR, CLL-1-CAR 10	113	ATGGCCCTCCCTGTACACGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC AAGTGCAACTTGTTCATATCCGGTGGAGGTCTTGTGCAGCCCGGAGGATCTCAGACTGTGCG TGCGCCGCTCTGGGTTCACTTTCTCCTCATACTCGATGAK,CTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGA AAGGGCCTGGAATGGGTGTCAATCTCCTCCTCATCTCCACCATCTACTACGCCGATTCC GTGAAGGGCCGCTTCACTATTTCCCGGGACAACGCGAAAACTCGCTCTATCTGCAAATGAA CTCCCTGCGCGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGACCTGAGCGTGC GGGCTA TTGATGCGTTCGACATCTGGGGACAGGGCACCATGGTACAGTGTCCAGCGGAGGCGGGCGC AGCGGTGGAGGAGGATCAGGGGGAGGAGTTCGGGGGAGCGGTGGCTCCGATATCGTGCTGA CCCAGAGCCCGTCGAGCCTCTCCGCCTCCGTGCGCGCAGAGTACCATCAGGTGTCAAGCAT CCCAGGACATTAGCAACTACCTGAATTGGTACCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCACCCAAGTTG CTGATCTACGACGCCCTCCAACCTGGAAACCGGAGTGCCATCCAGGTTCCTCGGGCAGCGGCTC GGGAACCGACTTCACTTTTACTATCTCCTCCCTGCAACCCGAGGATTCGCGACCTACTACTG CCAGCAGGCCTACAGCACCCCTTTACCTTTCGGGCCGGGAACTAAGGTGGAATCAAGACCA CTACCCCAGCACCAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCTCCACGCCTCTGTCCCTGC GTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCCT GCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGCTCTGCTGTTTCACTCGTGAT CACTCTTACTGTAAGCGCGGTCCGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCTTTCATGAG GCCTGTGCGAGCTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTTCAGGAGGAGGAGGAAG GCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAATTACGCCGACGCGCAGATGCTCCAGCTACAAGCAGGGG CAGAACCAGCTCTACAACGAACCTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAA GCGGAGAGGAGCGGGACCCAGAAATGGGCGGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCAAGAGGG CCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAA GGGGAACGCAGAAAGAGGCAAGGCCACGACGGAGTGTACCAGGACTCAGCACGCCACCA AGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG
146262		
146262- ак, ScFv-домен CLL-1-CAR 11	49	EVQLVQSGGGVVRSGRSLRLSCAK,SGFTFNSYGLHWVRQAPGKLEWVALIEYDGSNKYYGD SVKGRFTISRDKSKSTLYLQMDNLRADTA VYYCAREGNEDLAFDIWQGGLTVTVSSGGGGSG GGSGGGGGSGGGSEIVLTQSPSSLSASVGDRTITCQASQFIKKNLWYQHKPGKAPKLLIYDA SSLQTVGPSRFSGNRSGTTFSFTISSLQPEDVATY YCQQHNDNLPLTFGGGTCKVEIK
146262- нк, ScFv-домен CLL-1-CAR 11	62	GAAGTGCAATTGGTGCAATCAGGAGGAGGAGTGGTCAGATCTGGAAGAAGCCTGAGACTG TCATGCGCGGCTTCGGGCTTTACCTTCAACTCCTACGGCCTCCACTGGGTGCGCCAGGCCCC CGGAAAAGGCCTCGAATGGGTGCACTGATTGAGTACGACGGGTCCAACAAGTACTACGG AGATAGCGTGAAAGGGCCGCTTACCATCTCACGGGACAAGTCCAAGTCCACCTGTATCTG CAAATGGACAACCTGAGGGCCGAGGATACTGCCGTGTACTACTGCGCCCGCAAGGAAAC GAAGATCTGGCCTTCGATATTTGGGGCCAGGGTACTCTTGTGACCGTGTGCGAGCGAGGGCG GAGGCTCCGGTGGAGGAGGATCGGGGGTGGTGGTTCCGGCGCGGGGGAGCGCAATCG TGCTGACCCAGTCGCCTTCTCCTCCTCTCCGCTTCCGTGGGGGACCGGGTCACTATTACGTGTC AGGCGTCCCAATTTCATCAAGAAGAATCTGA ACTGGTACCAGCACAAGCCGGGAAAGGCC CCAAACTGCTCATCTACGACGCCAGCTCGCTGCAGACTGGCGTGCCTTCCCGGTTTTCCGGG AACC GTCGGGAACCACTTCTCATTCACCATCAGCAGCCTCAGCCGGAGGAGTGGCGCA CCTACTACTGCCAGCAGCATGACAACCTTCCACTGACTTTCGGCGGGGGACCAAGGTGCA GATTAAG
146262- ак, VH ScFv CLL-1-CAR 11	75	EVQLVQSGGGVVRSGRSLRLSCAASGFTFNSYGLHWVRQAPGKLEWVALIEYDGSNKYYGD SVKGRFTISRDKSKSTLYLQMDNLRADTA VYYCAREGNEDLAFDIWQGGLTVTVSS
146262- ак, VL ScFv CLL-1-CAR 11	88	EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCQASQFIKKNLWYQHKPGKAPKLLIYDASSLQTVGPSRFSGNR SGTTFSFTISSLQPEDVATY YCQQHNDNLPLTFGGGTCKVEIK
146262- ак, полный CAR, CLL-1-CAR 11	101	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGGGVVRSGRSLRLSCAASGFTFNSYGLHWVRQAPG KLEWVALIEYDGSNKYYGDSVKGRFTISRDKSKSTLYLQMDNLRADTA VYYCAREGNEDLA FDIWQGGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSEIVLTQSPSSLSASVGDRTITCQASQFIK NLWYQHKPGKAPKLLIYDASSLQTVGPSRFSGNRSGTTFSFTISSLQPEDVATY YCQQHNDNLPL TFGGGTCKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGT CGVLLLSIVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRCRFPEEEEGGCELRVKFSRSAD APAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
146262- нк, полный CAR, CLL-1-CAR 11	114	ATGGCCCTCCCTGTACACGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC GAAGTGCAATTGGTGCAATCAGGAGGAGGAGTGGTCAGATCTGGAAGAAGCCTGAGACTG TCATGCGCGGCTTCGGGCTTTACCTTCAACTCCTACGGCCTCCACTGGGTGCGCCAGGCCCC CGGAAAAGGCCTCGAATGGGTGCACTGATTGAGTACGACGGGTCCAACAAGTACTACGG AGATAGCGTGAAAGGGCCGCTTACCATCTCACGGGACAAGTCCAAGTCCACCTGTATCTG CAAATGGACAACCTGAGGGCCGAGGATACTGCCGTGTACTACTGCGCCCGCAAGGAAAC GAAGATCTGGCCTTCGATATTTGGGGCCAGGGTACTCTTGTGACCGTGTGCGAGCGAGGGCG GAGGCTCCGGTGGAGGAGGATCGGGGGTGGTGGTTCCGGCGCGGGGGAGCGGAAATCG TGCTGACCCAGTCGCCTTCTCCTCCTCCTCCGCTTCCGTGGGGGACCGGTCACTATTACGTGTC AGGCGTCCCAATTTCATCAAGAAGAATCTGA ACTGGTACCAGCACAAGCCGGGAAAGGCC CCAAACTGCTCATCTACGACGCCAGCTCGCTGCAGACTGGCGTGCCTTCCCGGTTTTCCGGG AACC GTCGGGAACCACTTCTCATTCACCATCAGCAGCCTCCAGCCGGAGGACGTGGCGA CCTACTACTGCCAGCATGACAACCTTCCACTGACTTTCGGCGGGGGACCAAGGTGCA GATTAAGACCACTACCCAGCAGCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCAGC CTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGACGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGG TCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTTCGGGGTCTGCTGCT GCTTTCACCTCGTGATCACTCTTACTGTAAGCGCGGTCCGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTA AGCAACCTTTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGT CCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAATTCAGCCGAGCGCAGATGC TCCAGCCTACAAGCAGGGGCGAAGCAGCTCTACAACGAACCTCAATCTTGGTCCGAGAGAG

		GAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGGAAGCCGCGC AGAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAGATGGCAGAAAGCC TATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTAC CAGGGACTCAGCACCCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGCCCTGCCGC CTCGG
146263		
146263- ак, ScFv-домен CLL-1-CAR 12	50	QVQLVESGGGLVQPGLSLRLSCAK,SGFNVSSNYMTWVRQAPGKGLEWVSVIYSGGATYYGDS VKGRFTVSRDNSKNITYLQMNRLTAEDTAVYYCARDRLYCGNNCYLYYYYGMDVWGQGT LTVVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIQVTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQK PGKAPKLLIYAASLLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQYSYSTPLTFGQGTKV EIK
146263- нк, ScFv-домен CLL-1-CAR 12	63	CAAGTGCAACTCGTGGAATCAGGCGGAGGACTCGTGCAACCCGGAGGTTCCCTTAGACTGT CATGTGCCGCTTCCGGGTTCATATGTGTCCAGCAACTACATGACCTGGGTGAGACAGCGCCG GGAAGGGACTTGAATGGGTGTCCGTGATCTACTCCGGTGGAGCAACATACTACGGAGACT CCGTGAAAGGCCGCTTTACCGTGTCCGCGATAACTCGAACACCGTGTACTGTCAGAT GAACAGGCTGACTGCCGAGGACACCGCCGTGTATTATTGCGCCCGGGACAGGCTGTACTGT GGAACAACACTGTACTCTACTACTACTACGGGATGGACGTGTGGGGACAGGGCACTCTCG TCACTGTGTATCCGGGGGGCGGTAGCGGTGGCGGAGGTCGCGCGGAGGAGGCTCAGG GGGAGGCGGAAGCGATATCCAGGTCACCCAGTCTCCCTCCTCGCTGTCCGCCTCCGTGGGCG ACCGCGTCACCATTAATTGCGGGGCGTGCAGTCGATCAGCTCCTACCTGAACCTGGTACCAG CAGAAGCTGGAAGGCCCGGAAGCTGTCTGATCTACGCGGCCCTGTCCTGCAAGCGCGCG TCCGTCGCGGTTACGCGGTTCCGGTTCGGGAACCGACTTACCTGACTATTTCCTCCCTGC AACCCGAGGATTCGCCACTTACTACTGCCAGCAGTCTACTCCACCCACCTCTGACCTTC GGCCAAGGAACCAAGGTGCAATCAAG
146263- ак, VH ScFv CLL-1-CAR 12	76	QVQLVESGGGLVQPGLSLRLSAAAGFNVSSNYMTWVRQAPGKGLEWVSVIYSGGATYYGDS VKGRFTVSRDNSKNITYLQMNRLTAEDTAVYYCARDRLYCGNNCYLYYYYGMDVWGQGT LTVVSS
146263- ак, VL ScFv CLL-1-CAR 12	89	DIQVTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASLLQSGVPSRFSGSG SGTDFLTITSLQPEDFATYYCQYSYSTPLTFGQGTKVEIK
146263- ак, полный CAR, CLL-1-CAR 12	102	MALPVTALLPLALLLHAARPQVQLVESGGGLVQPGLSLRLSAAAGFNVSSNYMTWVRQAPG KGLEWVSVIYSGGATYYGDSVKGRFTVSRDNSKNITYLQMNRLTAEDTAVYYCARDRLYCGN NCYLYYYYGMDVWGQGTLYTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIQVTQSPSSLSASVGDRT ITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASLLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFAT Y YCQYSYSTPLTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPTIASQPLSRPQACRAAGGAVHTRGLDFAC DIYWAPLAGTTCGVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRVETTQEDGCGSCRFPEEEGGC ELRVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
146263- нк, полный CAR, CLL-1-CAR 12	115	ATGGCCCTCCCTGTCAACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTGTGCTACCGCCGCTCGGCC CAAGTGCAACTCGTGGAAATCAGGCGGAGGACTCGTGCAACCGGAGGTTCCCTTAGACTGT CATGTGCCGCTTCCGGGTTCATATGTGTCCAGCAACTACATGACCTGGGTGAGACAGCGCCG GGAAGGGACTTGAATGGGTGTCCGTGATCTACTCCGGTGGAGCAACATACTACGGAGACT CCGTGAAAGGCCGCTTTACCGTGTCCGCGGATAACTCGAAGAACACCGTGTACTTGACAT GAACAGGCTGACTGCCGAGGACACCGCGTGTATTATTGCGCCCGGACAGGCTGTACTGT GGAACAACACTGTACTCTACTACTACTACGGGATGGACGTGTGGGGACAGGGCACTCTCG TCACTGTGTATCCGGGGGGGGCGGTAGCGGTGGCGGAGGTCGCGCGGAGGAGGCTCAGG GGGAGGCGGAAGCGATATCCAGGTACCCAGTCTCCCTCCTCGCTGTCCGCTCCGCTCGCGC ACCGCGTCACCATTAATTGCGGGGCGTGCAGTCGATCAGCTCCTACCTGAACCTGGTACCAG CAGAAGCTGGAAGGCCCGGAAGCTGTCTGATCTACGCGGCTCTGTCCTTGCAAGCGCGCG TCCCGTCGCGGTTACGCGGTTCCGGTTCGGGAACCGCACTTACCCTGACTATTTCTCCCTGC AACCAGGAGATTTCGCCACTTACTACTGCCAGGCTCTACTCCACCCCACTCTGACCTTC GGCCAAGGAACCAAGGTGCAAAATCAAGACCACTACCCAGCAGCAGGCGACCCACCCCG GCTCCTACCATCGCTCCAGCCTCTGTCCTTGCCTCGCGGAGGATCTAGACCCCGGAGCTGG TGGGGCGCTGCATACCGGGGCTTGTACTTGCCTGCGATATCTACATTGGGCCCTCTGG CTGGTACTTGGGGGCTCTGCTGCTTCTACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTGCG AAGAAAGCTGCTGTACATCTTAAAGCAACCCCTCATGAGGCTGTGACAGACTCAAGAGG AGGACGGCTGTTTCATGCCGTTTCCAGAGGAGGAGGAAGCGGCTGCAACTGCGCGTGA K,ATTACGCGCAGCGAGTGTCTCCAGCCTACAAGCAGGGGACAGCAACGCTCTACAACG AACTCAATCTTGCTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAAGCGGAGAGGACGGGACC CAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCC AAAAGGATAAGATGGCAGAAAGCCTATAGCAGAGATTGTTATGAAAGGGAACGCAGCAAGA GGCAAGGCCACGACGAGTGTACCAGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGAC GCTCTTCACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG
139115		
139115- ак, ScFv-домен CLL-1-CAR 1	39	EVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFTSSYAIWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDLEAMTGGYWGQGTLYTVSSGGGSGG GGSGGGSGSALTQPSVSGSGPGSITISCTGTSDDVGGYNYVSWYQHQPGLKAPLMIDVSNR PSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCYSSTSSSTLDVVFGGGTCLTVL
139115- нк, ScFv-домен CLL-1-CAR 1	52	GAAGTGCAACTCCAACAGTCAGGCGCAGAAAGTCAAGAAAGCCCGGATCGTCAGTGAAAGTG TCCTGCAAAAGCCTCCGGCGGAACCTTCAGCTCCTACGCAATCAGCTGGGTGCGGACGGCGC CCGACAGGACTGGAGTGGATGGCGGTATCATTCGATCTTTGGACCGGCAATTACGC CCAGAAGTTCAGGGAGCGGTCAATAACGCGCCGACGAAATCGACTTCCACCGCTACATG GAGCTGTCTGCTCTTGAAGGAGCGAAGATACCGCGGTGTACTACTGCGCTCGGGATCTGGAGA TGGCCACTATCATGGGGGGTTACTGGGGCCAGGGACCGCTGGTCACTGTCTCTCGGGAGG AGGGGACTACGGCGCGCGGTTCGCGGGGAGGAGGAAGCCAGTCGCTGGCTGACTCAGCC AGCTTCCGTGTCTGGTTCGCCGGGACAGTCCATCACTATTAGCTGTACCGGCACACGACGCG ACGTGGGCGGCTACAACATATGTGATGGTACCAGACGACCCGGGGAAGGCGCCTAAGT GATGATCTACGACGTGTCAACCGCCTAGCGAGTGTCAACAGATTCTCCGTTCTCGAAG TCAGGGAACACTGCCTCCCTCAGGATTAGCGGGCTGCAAGCCGAGGATGAAGCCGACTACT

		ACTGCTCCTCTATACCTCCTCTCGACCCTGGACGTGGTGTTCGGAGGAGGCACCAAGCTC ACCGTCCTT
5	139115- ак, VH ScFv CLL-1-CAR 1	65 EVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDLEMATIMGGYWGQGLTVTVSS
	139115- ак, VL ScFv CLL-1-CAR 1	78 QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFS GSKSGNTASLTISGLQAEDYCYSSYSSSTLDVVFVGGGKLTVL
10	139115- ак, полный CAR, CLL-1-CAR 1	91 MALPVTALLPLALLLHAAARPEVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSY AISWVRQAPGQ GLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDLEMATIMG GYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSQALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVS WYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGHNTASLTISGLQAEDYCYSSYSSSTL DVVFVGGGKLTVLTTTPAPRPPTPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPFEEEGGCELRVKFSR SADAPAYKQGNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAE AEAYSEIGMKGERRRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
15	139115- нк, полный CAR, CLL-1-CAR 1	104 ATGGCCCTCCCTGTACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGTCTCCACGCCGCTCGGCC GAAGTGCAACTCCAACAGTCAGCGCAGAAAGTCAAGAAGCCCGGATCGTCAGTGAAAGTG TCCTGCAAAGCCTCCGGCGGAACCTTCAGTCCTACGCAATCAGCTGGGTGCGGCAGGCGC CCGGACAGGGACTGGAGTGGATGGGCGGTATCATTCCGATCTTTGGCACCCGCCAATTACGC CCAGAAAGTTCCAGGGACGCGTCACAATCACCGCCGACGAATCGACTTCCACCGCCTACATG GAGCTGTCTGCTTGAAGGAGCGAAGATACCGCCGTGTACTATCGCTCGGGATCTGGAGA TGGCCACTATCAGGGGGTACTGGGGCCAGGGACCTTGGTCACTGTGCTCGGCTCGGAGG AGGGGGATCAGCGCGCGCGGTTCGGGGGAGGAGGAAGCCAGTCCGCGCTGACTCAGCC AGCTTCCGTGTCTGGTTCGCGCGGACAGTCCATCACTATTAGCTGTACCGGCACACGACGCG ACGTGGGCGGCTACAATACTGTGTCTGTTACGAGCAGCACCCGGGAAGGCGCCTAAGCT GATGATCTACGACGTGTCCAACCGCCCTAGCGGAGTGTCCAACAGACTTCCGCTTCGAAG TCAGGGAACACTGCCTCCCTCACGATTAGCGGGCTGCAAGCCGAGGATGAAGCCGACTACT ACTGCTCCTCTATACCTCCTCTCGACCCTGGACGTGGTGTTCGGAGGAGGCACCAAGCTC ACCGTCCTTACCACTACCCAGCAGCGAGGCCACCCACCCCGGCTCTACCATCGCTCCCA GCCTCTGTCCCTGCGTCCGAGGCATGTAGACCCGACGTGGTGGGGCCGTGCATACCCGG GGTCTTGACTTCGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCTCTG CTGCTTTCACCTCGTGATCACTCTTACTGTAAAGCGCGGTGCGAAGAAGCTGTGTATCATCTT TAAGCAACCTTTCATGAGGCTGTGCGAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCTCCG TTCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGTGCGAAGTGCCTGTGAATTCAGCCGACGCGAGAT GCTCCAGCCTACAAGCAGGGGACAGAACGAGCTCTACAACGAACCTCAATCTTGGTGGAGAG AGGAGTACGACGTGTGGACA, GCGGAGAGGACGGGACCCAGAACTGGGCGCGGAAGCCG CGCAGAAAGATCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAGGATAAGATGGCAGAA GCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGAGAGGCAAGAGGCAAGGCCACGACGGACTG TACCAGGACTCAGCACCGCCACCAK, GGACACCTATGACGCTCTTCATGCAGGCCCTGC CGCTCGG
20		139116
25	139116- ак, ScFv-домен CLL-1-CAR 2	40 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLS, SGFTFDDY AMHWVRQAPGKLEWVSLISDGGSTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRVEDTAVYYCARVFD SY YMDVWGK GTT VTVSSGGGSG GGGSGSGGSEIVLTQSPLSLPVP TPGQPASISCRSSQSLVYTDGNTYLNWFQQRPGQSPRR LIYKVS NRDSGVPDRFSGSDTDFLTKISRVEAEDVGIY YCMQGTHWSFTFGQGRLEIK
30	139116- нк, ScFv-домен CLL-1-CAR 2	53 GAAGTGCAATTTGGTGGAAAGCGGAGGAGGAGTGGTGAACCTGGAGGAAGCTGAGACTG TCATGTGCCGCTCGGGATTCACTTTTCGATGACTACGCAATGCACTGGGTCCGCCAGGCCCC CGGAAAGGGTCTGGAATGGGTGTCCCTCATCTCCGGCGATGGGGGTCCACTTACTATGCGG ATTCTGTGAAGGGCCGCTTCAATCTCCCGGACAAATCCAAGAACACTCTGTACCTTCAA ATGAACCTCCCTGAGGGTGGAGGACACCGCTGTGTACTCTGCGCGAGAGTGTTCGACTCGT ACTATATGGACGTCTGGGGAAGAGGACACCGTGACCGTGTCCAGCGGTGGCGGTGGATC GGGGGGCGGCGGCTCCGGAGCGGAGGTTCCGAGATTGTGCTGACTCAGTCGCCGTTGTCA CTGCCTGTACCCCGGCGAGCCGCGCTCCATTTCATGCCGCTCCGCGGACCGGCTGGTCTA CACCGATGGGAACACTTACCTCAACTGGTTCAGCAGCGCCAGGACAGTCCCCGCGGAGG CTGATCTACAAAGTGTCAAACCGGACTCCGGCGTCCCGATCGGTTCTCGGGAAGCGGCA GCGACACCGACTTACGCTGAAGATTTCCCGCGTGGAAAGCCGAGGACGTGGGCATCTACTA CTGTATGCAGGCGACCCACTGGTTCGTTACCTTCGGACAAGGAAGTGGCTCGAGATCAAG
35	139116- ак, VH ScFv CLL-1-CAR 2	66 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLS, SGFTFDDY AMHWVRQAPGKLEWVSLISDGGSTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRVEDTAVYYCARVFD SY YMDVWGK GTT VTVSS
40	139116- ак, VL ScFv CLL-1-CAR 2	79 EIVLTQSPLSLPVP TPGQPASISCRSSQSLVYTDGNTYLNWFQQRPGQSPRR LIYKVS NRDSGVPDR FSGSGSDTDFLTKISRVEAEDVGIY YCMQGTHWSFTFGQGRLEIK
45	139116- ак, полный CAR, CLL-1-CAR 2	92 MALPVTALLPLALLLHAAARPEVQLVESGGGVVQPGGSLRLS, SGFTFDDY AMHWVRQAP GKLEWVSLISDGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRVEDTAVYYCARVFD SY Y MDVWGK GTT VTVSSGGGSGGGGSGGGSEIVLTQSPLSLPVP TPGQPASISCRSSQSLVYTDGNT YLNWFQQRPGQSPRR LIYKVS NRDSGVPDRFSGSGSDTDFLTKISRVEAEDVGIY YCMQGTHWS FTFGQGRLEIKTTTPAPRPPTPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPFEEEGGCELRVKFSR SADAPAYKQGNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAE AEAYSEIGMKGERRRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
	139116- нк, полный CAR, CLL-1-CAR 2	105 ATGGCCCTCCCTGTACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGTCTCCACGCCGCTCGGCC GAAGTGCAATTTGGTGGAAAGCGGAGGAGGAGTGGTGAACCTGGAGGAAGCCTGAGACTG TCATGTGCCGCTCGGGATTCACTTTTCGATGACTACGCAATGCACTGGGTCCGCCAGGCCCC CGGAAAGGGTCTGGAATGGGTGTCCCTCATCTCCGGCGATGGGGGTTCACCTACTATCGCG ATTCTGTGAAGGGCCGCTTCAATCTCCCGGACAAATCCAAGAACACTCTGTACCTTCAA ATGAACCTCCCTGAGGGTGGAGGACACCGCTGTGTACTACTGCGCGAGAGTGTTCGACTCGT

5		ACTATATGGACGTCTGGGGAAAGGGACACCGTGACCGTGTCCAGCGGTGGCGGTGGATC GGGGGGCGGGGCTCCGGGAGCGGAGGTTCGAGATTGTGCTGACTCAGTCGCCGTTGTCA CTGCCTGTACCCCCCGGGCAGCCGGCCTCCATTTTCATGCCGGTCCAGCCAGTCCCTGGTCTA CACCGATGGGAACACTTACCTCAACTGGTTCCAGCAGCGCCAGGACAGTCCCCCGGGAGG CTGATCTACAAAGTGTCAAACCGGGACTCCGGCGTCCCCGATCGTTCTCGGGAAGCGGCA GCGACACCGACTTCACGCTGAAGATTTCCCGCGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCATCTACTA CTGTATGCAGGGCACCACCTGGTCTGTTTACCTTCGGACAAGGAACCTAGGCTCGAGATCAAG ACCACTACCCAGCACCAGGAGGCCACCCACCCGGCTCCTACCATCGCTCCAGCCTCTGTG CCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGCGAGCTGGTGGGGCGGTGCATACCCGGGTCTTGAC TTCGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGTCTGTGCTGCTTTCA CTCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTCCGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACC CTTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTTCCTCAGAG GAGGAGGAAGGCGGTGCGAACTGCGCGTGAAATTCAGCCGAGCGCAGATGCTCCAGCC TACAAGCAGGGGCGAGAACCAGCTCTACAACGAACCTCAATCTTGGTCTGGAGAGGAGTAC GACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGCGGGAAGCCGCGCAGAAA GAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAG CGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGG ACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG
		139118
15	41	139118- ак, ScFv-домен CLL-1-CAR 3 QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIQPPGKLEWIGSIYYSGSTYYNPSLK SRVSISVDTSKNQFSLKLKYVTAADTAVYYCATPGTYDFLSGYYPFYWGQGLTVTVSSGGGG SGGGGSGGGSDIVMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLT QSGVPSRFSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSYPYTFGQGTKLEIK
20	54	139118- нк, ScFv-домен CLL-1-CAR 3 CAAGTGCAGCTTCAAGAAAGCGGTCCAGGACTCGTCAAGCCATCAGAAACTCTTTCCCTCA CTTGTAACCGTGTGGGAGGAGCAGCATCTCCTCGAGCTCCTACTACTGGGGTGGATTAGACAG CCCCCGGGAAGGGGTGGAGTGGATCGGTTCCATCTACTACTCGGGTGCAGCTACTACA ACCTTCCCTGAAATCTCGGGTGTCCATCTCCGTCGACACCTCCAAGAACCAGTTCAGCCTG AAGCTGAAATATGTGACCGCGGCCGATCTGCCGTGTACTATTGCCGCCACCCCGGGAACCT ACTACGACTTCTCTCGGGTACTACCCGTTTACTGGGGACAGGGGACTCTCGTGACCGTG TCCTCGGGCGGCGGAGGTTCAAGCGGTGGCGGATCGGGGGGAGGAGGCTCAGACATTGTGA TGACCCAGAGCCCGTCCAGCCTGAGCGCTCCGTTGGGCGATAGGGTACAGATTACTTGCCG GGCGTCCAGGGAATCTCAAGTACCTGGCCTGGTACCAACAGAAGCCCGAAAGGCACC CAAGTTGCTGATCTATGCCGCTAGCACTCTGCAGTCCGGGGTGCTCTCCCGCTTCTCCGCT CCGGCTCGGGCACCAGCTTACCCTGACCATTCTCTCACTGCAACCCGAGGACTTCGCCACT TACTACTGCCAGCAGCTGAACTCCTACCCTTACACATTCCGACAGGGAACCAAGCTGGA TCAAG
25	67	139118- ак, VH ScFv CLL-1-CAR 3 QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIQPPGKLEWIGSIYYSGSTYYNPSLK SRVSISVDTSKNQFSLKLKYVTAADTAVYYCATPGTYDFLSGYYPFYWGQGLTVTVSS
25	80	139118- ак, VL ScFv CLL-1-CAR 3 DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSYPYTFGQGTKLEIK
30	93	139118- ак, полный CAR, CLL-1-CAR 3 MALPVTALLPLALLLHAARPQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIQPPG KLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKSRSISVDTSKNQFSLKLKYVTAADTAVYYCATPGTYDFLSG YYPFYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSDIVMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSYL AWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSYPYTF GQGTKLEIKTTTPAPRPPTPTIASQPLSLRPEACRPAKGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTC GVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSR SADA PAYKQGNQNLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAY SEIGMKGERRRGKHGDLGYQLGLSTATKDTYDALHMQALPPR
35	106	139118- нк, полный CAR, CLL-1-CAR 3 ATGGCCCTCCCTGTACCCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGTCCACGCCGCTCGGCC CAAGTGCAGCTTCAAGAAAGCGGTCCAGGACTCGTCAAGCCATCAGAAACTCTTTCCCTCA CTTGTAACCGTGTGGGAGGAGCAGCATCTCCTCGAGCTCCTACTACTGGGGTGGATTAGACAG CCCCCGGGAAGGGGTGGAGTGGATCGGTTCCATCTACTACTCGGGTGCAGCTACTACA ACCTTCCCTGAAATCTCGGGTGTCCATCTCCGTCGACACCTCCAAGAACCAGTTCAGCCTG AAGCTGAAATATGTGACCGCGGCCGATCTGCCGTGTACTATTGCCGCCACCCCGGGAACCT ACTACGACTTCTCTCGGGTACTACCCGTTTACTGGGGACAGGGGACTCTCGTGACCGTG TCCTCGGGCGGCGGAGGTTCAAGCGGTGGCGGATCGGGGGAGGAGGCTCAGATTTGTGA TGACCCAGAGCCCGTCCAGCCTGAGCGCTCCGTTGGGCGATAGGGTACAGATTACTTGCCG GGCGTCCAGGGAATCTCAAGTACCTGGCCTGGTACCAACAGAAGCCCGAAAGGCACC CAAGTTGCTGATCTATGCCGCTAGCACTCTGCAGTCCGGGGTGCTTCCCGCTTCTCCGCT CCGGCTCGGGCACCAGCTTACCCTGACCATTCTCTCACTGCAACCCGAGGACTTCGCCACT TACTACTGCCAGCAGCTGAACCTCCTACCCTTACACATTCCGACAGGGAACCAAGCTGGA TCAAGACCACTACCCAGCACCAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCTCCAGCCT CTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGGTGGGGCGGTGCATACCCGGGGT TTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGTCTGTGCTG TTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTCCGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAG CAACCCTTCATGAGGCTGTGCACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCCGGTTC CAGAGGAGGAGGAAGGCGGTGCGAACTGCGCGTGAAATTCAGCCGAGCGCAGATGCTC CAGCCTACAAGCAGGGGCGAGAACCAGCTCTACAACGACTCAATCTTGGTGGAGAGGAGGA GTACGACGTGCTGGACAKGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCA GAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCT ATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAGGCCACGACGGACTGTACC AGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGCCCTGCCGCC TCGG
40		139122
45	42	139122- ак, ScFv-домен CLL-1-CAR 4 QVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSYWMSWVRQAPGKLEWVANINEDGSAKFYVD SVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAREDVAVYFCARDLRSGRYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSEIVLTQSPGTLSPGGRATLSCRASQISGFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP

			DRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQYQYSSPPTFGLGKLEIK
5	139122- нк, ScFv-домен CLL-1-CAR 4	55	CAAGTGCAACTCGTGAATCTGGTGGAGGACTCGTGCAACCCGGAGGATCATTGCGACTCT CGTGTGCGGCATCCGGCTTTACCTTTTCATCCTACTGGATGTCTGGGTGACAGAGGCCCCC GGGAAGGGACTGGAATGGGTGCGGAACATCAACGAGGACGGCTCGGCCAAGTTCTACGTG GACTCCGTGAAGGGCCGCTTACGATCTCACGGGATAACGCCAAGAATTCCTGTATCTGC AAATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACTGCGGTGTACTTCTGCGCAGCGGACCTGAGGTC CGGGAGATACTGGGGACAGGGCACCTCTGTGACCGTGTGAGCGGAGGAGGGGGTTCGGG CGGCGGCGGTTCCGGTGGCGGCGGTAGCGAAATTGTGTTGACCCAGTCCCCTGGAACCCCTG AGCCTGTACCTGGAGGACGCGCCACCCTGTCTGCCGGGCCAGCCAGAGCATCTCAGGGT CCTTCCTGGCTTGGTACCAGCAGAAGCCGGGACAGGCTCCGAGACTTCTGATCTACGGCGCC TCCTCGCGGGCGACCGGAATCCCGGATCGGTTCTCCGGCTCGGGAAGCGGAAGTGAATCA CTCTTACCATTTCGCCCTGGAGCCGGAAGATTTGCGCGTGTACTACTGCCAGCAGTACGGG TCATCCCCCTCAACCTTCGGCCTGGGAACCTAAGCTGGAAATCAAA
10	139122- ак, VH ScFv CLL-1-CAR 4	68	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYWMSWVRQAPGKGLEWVANINEDGSAKFYVD SVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDLRSRGYWGQGLTVTVSS
	139122- ак, VL ScFv CLL-1-CAR 4	81	EIVLTQSPGTLSLSPGGRATLSCRASQISGSFLAWYQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSG SGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQYQYSSPPTFGLGKLEIK
15	139122- ак, полный CAR, CLL-1-CAR 4	94	MALPVTALLPLALLLHAARPQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYWMSWVRQAPG KGLEWVANINEDGSAKFYVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDLRSRGY WGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGGRATLSCRASQISGSFLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQYQYSSPPTFGLGK LEIKTTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVL LVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGDCSFRPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQG QNQLYNELNLGRREYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKDMAEAYSEIGMKG ERRRKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
20			ATGGCCCTCCCTGTACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTGTCTCCACGCCGCTCGGCC CAAGTGCAACTCGTGAATCTGGTGGAGGACTCGTGCAACCCGGAGGATCATTGCGACTCT CGTGTGCGGCATCCGGCTTTACCTTTTCATCCTACTGGATGTCTGGGTGACAGAGGCCCCC GGGAAGGGACTGGAATGGGTGCGGAACATCAACGAGGACGGCTCGGCCAAGTTCTACGTG GACTCCGTGAAGGGCCGCTTACGATCTCACGGGATAACGCCAAGAATTCCTGTATCTGC AAATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACTGCGGTGTACTTCTGCGCACGCGACCTGAGGTC CGGGAGATACTGGGGACAGGGCACCTCTGTGACCGTGTGAGCGGAGGAGGGGGTTCGGG CGGCGGCGGTTCCGGTGGCGGCGGTAGCGAAATTGTGTTGACCCAGTCCCCTGGAACCCCTG AGCCTGTACCTGGAGGACGCGCCACCCTGTCTGCCGGGCCAGCCAGAGCATCTCAGGGT CCTTCCTGGCTTGGTACCAGCAGAAGCCGGGACAGGCTCCGAGACTTCTGATCTACGGCGCC TCCTCGCGGGCGACCGGAATCCCGGATCGGTTCTCCGGCTCGGGAAGCGGAAGTGAATCA CTCTTACCATTTCCCGCCTGGAGCCGGAAGATTTGCGCGTGTACTACTGCCAGCAGTACGGG TCATCCCCCTCCAACCTTCGGCCTGGGAACCTAATGGAATCAAAACCACTACCCAGCACCG AGGCCACCCACCCGGCTCCTACCATCGCTCCACGCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATG TAGACCCGAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCTGCGATATCTACA TTTGGGCCCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACT GTAAGCGCGGTTCGGAAGAAGCTGTCTGTACATCTTTAAGCAACCTTTCATGAGGCCTGTGCA GACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTTCACGAGGAGGAGGAAGGCGGGCTG CGAAGTGGCGGTGAAATTCAGCCGACGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCGAGAA CCAGCTCTACAACGAAGTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGG AGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAAATCCCCAAGAGGGCCT GTACAACGAGCTCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAGG GGAACGCAGAAGAGGCAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGACTCAGACCCGCCACCAA GGACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG
25	139122- нк, полный CAR, CLL-1-CAR 4	107	
30			139117
35	139117- ак, ScFv-домен CLL-1-CAR 5	43	EVQLQQSGPGLVRPSETLSLTCTVSGGPVRSRSHYWNWIRQPPGRGLEWIGYIYSGSTNPNPSL ENRVTISIDTSNNHFSKLSSVTAADTALYFCARGTATFDWNFPFDSWGQGLTVTVSSGGGSG GGSGSGSDIQMTQSPSSLSASIGDRVITITCRASQSISSYLNWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSG VPSRFSGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQYSYSTPWTFGQGTGLEIK
40	139117- нк, ScFv-домен CLL-1-CAR 5	56	GAAGTGCAACTCCAACAATCCGGTCCAGGACTCGTCAGACCCTCCGAAACTCTCTCGCTTA CATGCACTGTGTCCGGCGGCCCTGTGCGGTCCGGCTCTCATTACTGGAAGTGGATTGCCAG CCCCGGGACGCGGACTGGAGTGGATCGGCTACATCTATTACTCGGGGTGCACTAACA ACCCGAGCCTGGAATAAGAGTGACCATCTCAATCGACAGTCCAACAACCACTTCTCGCT GAAGTTGTCTCTCGTGACTGCCGCCGATACTGCCCTGTACTTCTGTGCTCGCGGAACCGCCA CCTTCGACTGGAACCTCCCTTTTGACTCATGGGGCCAGGGGACCCTTGTGACCGTGTCCAGC GGAGGAGGAGGCTCCGGTGGTGGCGGGAGCGGTAGCGGCGGAAGCGACATCCAGATGACC CAGTCACCGTCTCGTGTCCGATCCATTGGGGATCGGGTCACTATTACTTGCCGGGCGT CCAGTCCATCTCGTCTACCTGAAGTGTATCAGCAGAAGCCAGGGGAKAGCCCCAAGCTG CTGATCTACGCGGCCAGCAGCCTGCAGTCAGGAGTGCCCTCAAGGTTTAGCGGCACGGGAT CGGGAACCGACTTCAACCTGACCATTTCTCCCTCAACCCGAGGATTTCCGCCACCTACTAC TGCCAGCAGTCTACTCCACCCCGTGGACCTTCGGACAGGGAACCAAGCTGGAGATCAAG
45	139117- ак, VH ScFv CLL-1-CAR 5	69	EVQLQQSGPGLVRPSETLSLTCTVSGGPVRSRSHYWNWIRQPPGRGLEWIGYIYSGSTNPNPSL ENRVTISIDTSNNHFSKLSSVTAADTALYFCARGTATFDWNFPFDSWGQGLTVTVSS
	139117- ак, VL ScFv CLL-1-CAR 5	82	DIQTQSPSSLSASIGDRVITITCRASQSISSYLNWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTITISLQPEDFATYYCQYSYSTPWTFGQGTGLEIK
	139117- ак, полный CAR, CLL-1-CAR 5	95	MALPVTALLPLALLLHAARPEVQLQQSGPGLVRPSETLSLTCTVSGGPVRSRSHYWNWIRQPP GRGLEWIGYIYSGSTNPNPSLENRVTISIDTSNNHFSKLSSVTAADTALYFCARGTATFDWNF PFDSWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASIGDRVITITCRASQSISSYLNW YQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQYSYSTPWTFGQ

		GTKLEIKTTTPAPRPPTPTPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCGVL LLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
5	139117- нк, полный CAR, CLL-1-CAR 5	108
10		ATGGCCCTCCCTGTACCCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGTCCACGCCGCTCGGCC GAAGTGCAACTCCAACAATCCGGTCCAGGACTCGTCAGACCCTCCGAACCTCTCTCGCTTA CATGCACTGTGTCCGGCGGCCCTGTGCGGTCCGGCTCTCATTACTGGAAGTGGATTGCGCCAG CCCCCGGGACGCGGACTGGAGTGGATCGGCTACATCTATTACTCGGGGTGCACTAACTACA ACCCGAGCCTGGAAAATAGAGTGACCATCTCAATCGACACGTCCAACAACCACTTCTCGCT GAAGTTGTCTCCGTGACTGCCGCCGATACTGCCTGTACTTCTGTGCTCGGGAACCGCCA CCTTCGACTGGAACCTTCCCTTTTGAAGTCAATGGGGCCAGGGGACCTTGTGACCGTGTCCAGC GGAGGAGGAGGCTCCGGTGGTGGCGGGAGCGGTAGCGGCGGAAGCGACATCCAGATGACC CAGTCACCGTCTCTCGCTGTCCGCATCCATTGGGGATCGGGTCACTATTACTTGCCTGGCGTGC CCAGTCCATCTCGTCTACCTGAAGTGGTATCAGCAGAAGCCAGGGAAGCCCCCAAGCTG CTGATCTACGCGGCCAGCAGCTGCAGTCAGGAGTGCTTCAAGGTTTACGGGACGCGGAT CGGGAACCGACTTACCCTGACCATTTCTCCCTCCAACCCGAGGATTTCGCCACCTACTAC TGCCAGAGTCTACTCCACCCGTGGACCTTCGGACAGGGAACCAAGCTGGAGATCAAGA CCACTACCCAGCACCAGGACCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCTCCAGCCTCTGTCC CTGCGTCCGGAGGCGATGTAGACCCGACGTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACT TCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCYGGGTCTGTCTGCTTTAC TCGTGATCACTTTTACTGTAAGCGCGGTCCGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCC TTCATGAGGCCTGTGCACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTATCGCGGTTCGCCAGAG AGGAGGAAGCGGCTGCGAAGTGCCTGAAATTCAGCCGAGCGAGTGCAGCTTCCAGCCTA CAAGCAGGGGCGAGAACCAGCTCTACAACGAAGTCAATCTTGGTCCGAGAGAGGAGTACGA CGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGA ATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCG AGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAAGGGCAAGGCCACGACGAGTGTACCCAGGAC TCAGACCCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG
15		139120
20	139120- ак, ScFv-домен CLL-1-CAR 7	45
25	139120- нк, ScFv-домен CLL-1-CAR 7	58
30	139120- ак, VH ScFv CLL-1-CAR 7	71
35	139120- ак, VL ScFv CLL-1-CAR 7	84
40	139120- ак, полный CAR, CLL-1-CAR 7	97
45	139120- нк, полный CAR, CLL-1-CAR 7	110
		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSV KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPSSSGSYYMEDSYYYGMDVWGQGT TVSSGGGSGGGSGGGSGGGSNFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGSSGSIASNYVQWYQQR PSAPT TVIYEDNQRPSPGVPDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSNQV VFGGGTKLTVL
		GAAGTGCAATTGGTGGAATCTGGAGGAGGACTTGTGAAACCTGGTGGAAGCCTGAGACTTT CCTGTGCGGCCTCGGGATTCACTTTCTCCTCCTACTCCATGAAGTGGGTACAGACAGGCCCT GGGAAGGACTGGAATGGGTGTATCCATCTCCTCCTCATCGTCTACATCTACTACGCCGA TAGCGTGAAGGGCGGTTTACCATTTCCTGGGACAAACGCTAAGAACAGCCTCTATCTGCAA ATGAATTCCTCCGCGCGGAGGACACTGCCGTGTACTACTGCGCGAGGGACCCCTCATCAA GCGGCAGCTACTACATGGAGGACTCGTATTACTACGGAATGGAGCTGTGGGGCCAGGGAAC CACTGTGACGGTGTCTCCGTGGAGGGGCTCCGGGGCGGGGATCTGGCGGAGGAGGC TCCAACCTCATGTGACCCAGCCGACTCCGTGTCCGAAGGCCCGGAAAGCCGTGACAA TTTCTCGACCGGGTCTCCGGCTCGATCGCATCAAACTACGTGCAGTGGTACCAGCAGCGC CCGGGACGCGCCCCACCACTGTCTACGAGGATAACAGCGCGCCGTGGGTGTCCCA ACCGGTTTTCCGGTTCGATCGATAGCAGCAGCAACAGCGCCTCCTGACCATTTCCGGCTC AAGACCGAGGATGAGGCTGACTACTACTGCCAGTCTATGACTCCTCGAACCAAGTGGTGT TCGGTGGCGGCACCAAGCTGACTGTGCTG
		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSV KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPSSSGSYYMEDSYYYGMDVWGQGT TVT VSS
		NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGSSGSIASNYVQWYQQRPSAPT TVIYEDNQRPSPGVPDRFSG SIDSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSNQV VFGGGTKLTVL
		MALPVTALLPLALLHAARPEVQIVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPG KGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPSSSGSY MEDSYYYGMDVWGQGT TVT VSSGGGSGGGSGGGSNFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGSS GSIASNYVQWYQQRPSAPT TVIYEDNQRPSPGVPDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQ SYDSSNQV VFGGGTKLTVLTTTPAPRPPTPTPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAFLAGTCGVL LSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
		ATGGCCCTCCCTGTACCCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGTCCACGCCGCTCGGCC GAAGTGCAATTGGTGGAATCTGGAGGAGGACTTGTGAAACCTGGTGGAAGCCTGAGACTTT CCTGTGCGGCCTCGGGATTCACTTTCTCCTCCTACTCCATGAAGTGGGTACAGACAGGCCCT GGGAAGGACTGGAATGGGTGTATCCATCTCCTCCTCATCGTCTACATCTACTACGCCGA TAGCGTGAAGGGCGGTTTACCATTTCCTGGGACAAACGCTAAGAACAGCCTCTATCTGCAA ATGAATTCCTCCGCGCGGAGGACACTGCCGTGTACTACTGCGCGAGGGACCCCTCATCAA GCGGCAGCTACTACATGGAGGACTCGTATTACTACGGAATGGAGCTGTGGGGCCAGGGAAC CACTGTGACGGTGTCTCCGTGGAGGGGCTCCGGGGCGGGGATCTGGCGGAGGAGGC TCCAACCTCATGTGACCCAGCCGACTCCGTGTCCGAAGGCCCGGAAAGCCGTGACAT TTCTGCACCGGGTCTCCGGCTCGATCGCATCAAACTACGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCC CGGGCAGCGCCCCACCACTGTCTACGAGGATAKCCAGCGGCCGTGGGTGTCCGAGA CCGGTTTTCCGGTTCGATCGATAGCAGCAGCAK.CAGCGCTCCTGTACCATTTCCGGCTCA AGACCGAGGATGAGGCTGACTACTACTGCCAGTCTATGACTCCTCGAACCAAGTGGTGT CGGTGGCGGCACCAAGCTGACTGTGCTGACCACTACCCAGCACCAGGCCACCCACCCCG GCTCCTACCATCGCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCGATAGACCCCGACGCTGG TGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATACATTTGGGCCCCCTGTGG CTGGTACTTGCGGGGTCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTACTGTAAGCGCGGTTCGG AAGAAGCTGTGTACATCTTTAAGCAACCCCTCATGAGGCCTGTGCAAGTACTACTAAGAGG AGGACGGCTGTTCATGCCGTTCCAGAGGAGGAGGAAGCGCGGTGCGAAGTGCAGCTGGA AATTCAGCCGACGCGAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCGAGAACCAGCTCTACAACGA

			ACTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCC AGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCA AAAGGATAAGATGGCAGAAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAAGAG GCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACG CTCTTCACATGCAGGCCCTGCCGCCTCGG
			139121
5	139121- ак, ScFv-домен CLL-1-CAR 8	46	QVNLRESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYEMNWVRQAPGKLEWVSYISSSGSTIYYADSV KGRFTISRDNANKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCAREALGSSWEWGQTTTVTSSGGGGSGGGG SGGGGSDIQMTQSPSSLASVGDRTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVP SRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQYDNLPLTFGGGTKEIK
10	139121- нк, ScFv-домен CLL-1-CAR 8	59	CAAGTGAACCTGAGAGAAAGCGGCGGAGGACTTGTGCAACCTGGAGGAAGCCTGAGACTG TCATGTGCCGCGTCCGGCTTCACCTTCTCGTCCTACGAGATGAACCTGGGTCCGCCAGGCACC GGGCAAAGGACTGGAATGGGTGTCTACATTTCTCTCGTCCGGGTCCACCATCTATTACGCCG ACTCCGTGA.GGGACGGTTCACCATCTCCCGGGACAACGCCAAGAACTCCCTCTACCTCCA ATGAACCTCACTGAGGGCAGAGGACACTGCGGTCTACTACTGCGCCGCGAAGCTTTGGGTA GCTCCTGGGAGTGGGGCCAGGGAACCACTGTGACCGTGTCTCTCGGGTGGAGGGGGCTCCGG TGGCGGGGGTTCAGGGGGTGGCGGAAGCGATATCCAGATGACTCAGTACCAAGCTCCCTG AGCGCCTCAGTGGGAGATCGGGTCACAATCACGTGCCAGGCGTCCCAGGACATTTCTAACT ACCTCAATTGGTACCAGCAGAAGCCGGGGAAGGCCCCCAAGCTTCTGATCTACGATGCCTC CAACCTGGAACCGGCGTGCCCTCCCGCTTCTCGGGATCGGGCAGCGGCAGTCACTTCACC TTTACCATCTCGTCCCTGCAACCTGAGGACATCGCCACCTATTACTGCCAGCAGTACGATAA CCTCCCGCTGACTTTCGGAGGCGGAACCTAAGCTGGAGATTAAG
15	139121- ак, VH ScFv CLL-1-CAR 8	72	QVNLRESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYEMNWVRQAPGKLEWVSYISSSGSTIYYADSV KGRFTISRDNANKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCAREALGSSWEWGQTTTVTSS
	139121- ак, VL ScFv CLL-1-CAR 8	85	DIQMTQSPSSLASVGDRTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVP SRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQYDNLPLTFGGGTKEIK
20	139121- ак, полный CAR, CLL-1-CAR 8	98	MALPVTALLPLALLHAARPQVNLRESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYEMNWVRQAPG KLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCAREALGSSWE WGQTTTVTSSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLASVGDRTITCQASQDISNYLNWYQ QKPGKAPKLLIYDASNLETGVP SRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQYDNLPLTFGGGTKEIK LEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA/VHTRGLDFACDIYIWPALAGTCVLLLS LVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPPEEEEGGCELRVKFSRADAPAYKQG QNQLYNELNLGRREYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
25			ATGGCCCTCCCTGTACACCGCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGTCTCCACGCCGCTCGGCC CAAGTGAACCTGAGAGAAAGCGGCGGAGGACTTGTGCAACCTGGAGGAAGCCTGAGACTG TCATGTGCCGCGTCCGGCTTCACCTTCTCGTCCTACGAGATGAACCTGGGTCCGCCAGGCACC GGGCAAAGGACTGGAATGGGTGTCTACATTTCTCTCGTCCGGGTCCACCATCTATTACGCCG ACTCCGTGAAGGGACGGTTCACCATCTCCCGGGACAACGCCAAGAACTCCCTCTACCTCCA AATGAACCTCACTGAGGGCAGAGGACACTGCGGTCTACTACTGCGCCCGCGAAGCTTTGGGT AGTCTCTGGGAGTGGGGCCAGGGAACCACTGTGACCGTGTCTCGGGTGGAGGGGGCTCCG GTGGCGGGGGTTACAGGGGGTGGCGGAAGCGATATCCAGATGACTCAGTACCAAGCTCCCT GAGCGCCTCAGTGGGAGATCGGGTCACAATCACGTGCCAGGCGTCCCAGGACATTTCTAAC TACCTCAATTGGTACCAGCAGAAGCCGGGGAAGGCCCCCAAGCTTCTGATCTACGATCGCT CCAACCTGGAACCGGCGTGCCCTCCCGCTTCTCGGGATCGGGCAGCGCACTGACTTCAC CTTTACCATCTCGTCCCTGCAACCTGAGGACATCGCCACCTATTACTGCCAGCAGTACGATA ACCTCCCGCTGACTTTCGAGGGCGGAACCTAAGCTGGAGATTAAGACCCTACCCAGCACC GAGGCCACCCACCCGGCTCCTACCATCGCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCAT GTAGACCCGCAGTGGTGGGGCGGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTAC ATTTGGGCCCCCTCTGGCTGTTACTTGCGGGGTCTGCTGCTTCACTCGTGATCACTCTTTAC TGTAAGCGCGGTGCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCCTTCATGAGGCGCTGTG AGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCTATGCCGGTTCAGAGGAGGAGGAAGGCGGT GCGAAGTGGCGGTGAATTCAGCCGCAGCGCAGATGCTCCAGCTACAAGCAGGGGCGAGA ACCAGCTCTACAK,CGAK,CTCAK,TCCTGGTGGAGAGGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAG CGGAGAGCGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAACTCCCCAAGAGGG CCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAA AGGGGAACGCAGAAAGAGGCAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGAAGTCAAGCACCGCCAC CAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGCCCTGCCGCCTCGG
			146264
40	146264- ак, ScFv-домен CLL-1-CAR 13	51	QVQLVQSGAEVKKSGASVKVSKASGYPTGYIYQWVRQAPGQGLEWMGWIDPNSGNTGYA QKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCASDSYGYYYGMDVWGQTLTVTSSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKPGKPPKLL IYDASSLESQVPSRFSGSGSDFTLTIISSLPEDFATYYCQFFNNYPLTFGGGTKEIK
45	146264- нк, ScFv-домен CLL-1-CAR 13	64	CAAGTGCAACTCGTCCAGTCCGGTGCAGAAAGTGAAGAAAGAGCGGAGCCTCAGTGAAAGTG TCCTGCAAGGCCTCCGGTTACCCCTTCACTGGATACTACATTCAGTGGGTCCGCCAAGCCCC GGGACAGGGTCTGGAGTGGATGGGGTGGATTGACCCTAAGCTCGGGAATACGGGATACGCG CAGAAAGTTCAGGGCCGCGTGACCATGACCAGGAACACCTCGATCAGCACCGCCTACATGG AACTGTCTCCCTGCGGTGCGGAGGATACTGCCGTGTACTACTGCGCTCCGATTCTCTATGGG TACTACTACGGAATGGAGCTCTGGGGACAGGGCACCCCTGTGACCGTGTCTCTCGGAGGCG GAGGGAGCGGCGGGGGTGGATCGGGAGGAGGCGGCTCCGGCGGCGGGCGGTAGCGACATCC AGATGACCCAGTACCATCAAGCCTTAGCGCTCCGTGGGCGACAGAGTGACATTCACTTG TCGGGCGTCCAGGGAATCTCCTCCGCTTGGCTTGGTATCAGCAGAAGCCTGGGAAGCCT CCGAAGCTGTTGATCTACGACGCGAGCAGCCTGGAATCAGGGGTGCCCTCCCGGTTTTCCGG GTCCGGTTCTGGCACCGATTTCACCCTGACCATTTCTGCTCCTCCAACCCGAGGACTTCGCCA CTTACTACTGCCAGCAGTTCAACAACCTACCCGCTGACCTTCGGAGGAGGCACTAAGGTGCA GATCAAG

5	146264- ак, VH ScFv CLL-1-CAR 13	77	QVQLVQSGAEVKKSGASVKVSKASGYPTGYIYQWVRQAPGQGLEWMGWIDPNSGNTGYA QKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCASDSYGYYYGMDVWGQGLTVTVSS
	146264- ак, VL ScFv CLL-1-CAR 13	90	DIQMTQSPSSLSASVGDRTFTCRASQGISSALAWYQQKPGKPKPLLIYDASSLESGVPSRFSGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNNTPLTFGGGKVEIK
	146264- ак, полный CAR, CLL-1-CAR 13	103	MALPVTALLLPLALLLHAARPOVQLVQSGAEVKKSGASVKVSKASGYPTGYIYQWVRQAPG QGLEWMGWIDPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCASDSYGYYY YGMDVWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTFTCRAS QGISSALAWYQQKPGKPKPLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFN NYPLTFGGGKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA LAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEEGGCELRVKFS RSADAPAYKQGNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
10	146264- нк, полный CAR, CLL-1-CAR 13	116	ATGGCCCTCCCTGTCAACGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGTCCACGCCGCTCGGCC CAAGTGCAACTCGTCCAGTCCGGTGCAGAAAGTGAAGAGCGGAGCCTCAGTGAAAGTG TCCTGCAAGGCCTCCGGTTACCCCTTCACTGGATACTACATTCAGTGGGTCCGCCAAGCCCC GGGACAGGGTCTGGAGTGGATGGGGTGGATTGACCTAAGTACGGGAAATACGGGATACGCG CAGAAAGTTCAGGGCCGCGTGACCATGACCAGGAACACCTCGACACCGCTACATGG AACTGTCTCCCTGCGGTGCGAGGATACTGCCGTGTACTACTGCGCCTCCGATTCTATGGG TACTACTACGGAATGGACGTCTGGGGACAGGGCACCCCTCGTGACCGTGTCTCGGGAGGCG GAGGGAGCGCGGGGGTGGATCGGGAGGAGGCGGCTCCGGCGCGGCTAGCGACATCC AGATGACCCAGTCACCATCAAGCCTTAGCGCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACATTCATTG TCGGGCGTCCAGGGAATCTCTCCGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAGCCTGGGAAGCCT CCGAAGCTGTTGATCTACGACGCGAGCAGCCTGGAATCAGGGGTGCCCTCCCGGTTTTCCGG GTCCGGTTCTGGCACCGATTTCACCTGACCATTTCTGCCCTCAACCCGAGGACTTCGCCA CTTACTACTGCCAGCAGTTCAACAACCTACCCGCTGACCTTCGGAGGAGGCACTAAGGTCGA GATCAAGACCACTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCTACCATCGCCTCCAG CCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGACGTGGTGGGGCGGTGCATCCACCGGG GTCTTGACTTCGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCTGCG TGCTTTCACTCGTGATCACTCTTACTGTAAAGCGCGGTCCGAAGAAGCTGCTGTACATCTTT AAGCAACCCCTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGCTGTTCATGCGCGT TCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGTGCGAACTGCGCGTGAAATTCAGCCGACGCGCAGATG CTCCAGCCTACAAGCAGGGGCGAGAACCAGCTCTACAACGAACCTAATCTTGGTCGGAGAGA GGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCG CAGAAAGAAATCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGGTCAGAGAAGC CTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAAGAGGCAAGGCCACGACGACTGTA CCAGGGACTCAGACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCCG CCTCGG
15			181268
20			181268- ак, VH ScFv
25	181268- ак, VL ScFv	195	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYEMNWVRQAPGKLEWVSYISSSGSTIYYADSV KGRFTISRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDPYSSSWHDAFDIWQGTMTVTVSS
	181268- ак, VL ScFv	196	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS GSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPLTFGGGKVDIK
30	181268- ак, полный CAR	197	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYEMNWVRQAPG KLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDPYSSSWH DAFDIWQGTMTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPLTFG GGTKVDIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA LAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEEGGCELRVKFS RSADAPAYKQGNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
35	181268- нк, полный CAR	198	ATGGCCCTCCCTGTCAACGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGTCCACGCCGCTCGGCC GAAGTGCAACTCGTGGAAAGCGGTGGAGGTCTGTGCAACCTGGAGGTCTTTCGCGCTGT CATGTGCAAGTCTCCGGCTTCACTTTCTCCTCGTACGAGATGAATGGGTGCGGAGCGCCT GGAAAGGGGCTGGAATGGGTGTCCTACATCTCAAGCTCCGGCTCGACCATCTACTACGCGG ACAGCGTGAAAGGGGCGGTTACGATTTCGAGGGACAAACGCCAAGAAGCTCGCTCTATCTGCA AATGAATCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCTGTGATTAAGTGCAGCGGGGACCCCTACTCCT CCTCATGGCAGCAGCCTTTGATATCTGGGGCAGGGAACCATGGTCACCGTCAGCAGCGG GGGCGGAGGTTCCGGGGGAGGGGGCTCCGGCGGAGGAGGCTCCGAGATTGTGTGACTCAG AGCCCGGGTACCCTGTGCTGAGCCCCGAGAGCGGGCCACCCCTTTCATGCCGCGCCAGCC AGTCCGTGTCTCATCTACCTCGCGTGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCCCGCGGCTG CTGATCTACGGCGCTCTCGCGCGCAACCGGAATCCCGACCGGTTCTCCGGGTCTGGCAG CGGAACCGACTTCACTCTCACCATTTCGAGGCTGGAGCCGGAAGATTTCGCCGTGTACTACT GCCAGCAGTACGGCTCCTCGCCACTGACTTTCGGCGGAGGAACCAAGGTCGATATCAAGAC CACTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCCGGCTCCTACCATCGCTCCAGCCTCTGTCCC TGCGTCCGAGGCATGTAGACCCGAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTCT GCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCTGTGCTTTCACTC GTGATCACTTTTACTGTAAAGCGCGGTCCGAAGAAGCTGCTGTACATCTTAK.GCAK.CCCT TCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGTTTCCAGAGGA GGAGGAAGGCGGTGCGAACTGCGCGTGAAATTCAGCCGAGCGGAGATGCTCCAGCCTAC AAGCAGGGGCGAGAACCAGCTCTACAACGAACCTAATCTTGGTCGAGAGAGGAGTACGAC GTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAA TCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAAGCCTATAGCGA GATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAAGAGGCAAGGCCACGACGACTGTACCAGGGACT CAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG
40			
45			

В воплощениях фрагменты CAR scFv затем клонируют в лентивирусные векторы

для создания конструкции полноразмерного CAR в одной кодирующей рамке и с использованием промотора EF1-альфа для экспрессии (SEQ ID NO: 11).

Промотор EF1-альфа

CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCG
 5 AGAAGTTGGGGGGAGGGGTTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGG
 GGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTAAGTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGG
 GAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTG
 CCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGG
 GTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGA
 10 TCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAG
 CCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGC
 GAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTA
 AAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGC
 GGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCCGGGCGGCGACGGGG
 15 CCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCCGGCAGGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCG
 AGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGC
 GCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTTCGGCACCAAGTTG
 CGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGG
 ACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCT
 20 TTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGC
 ACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGT
 TTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTT
 GGCACCTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTTCAT
 TCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGA

25 Gly/Ser (SEQ ID NO:25)
 GGGGS

Gly/Ser (SEQ ID NO:26): эта последовательность может охватывать 1-6 повторяющихся звеньев «Gly Gly Gly Ser»

GGGGSGGGGS GGGSGGGGS GGGSGGGGS

30 Gly/Ser (SEQ ID NO:27)
 GGGSGGGGS GGGSGGGGS

Gly/Ser (SEQ ID NO:28)
 GGGSGGGGS GGGGS

Gly/Ser (SEQ ID NO:29)
 35 GGGGS

ПолиА: (A)₅₀₀₀(SEQ ID NO:30)

Эта последовательность может охватывать 50-5000 аденинов.

ПолиА: (T)₁₀₀(SEQ ID NO:31)

40 ПолиА: (T)₅₀₀₀(SEQ ID NO:32)

Эта последовательность может охватывать 50-5000 тимининов.

ПолиА: (A)₅₀₀₀(SEQ ID NO:33)

Эта последовательность может охватывать 100-5000 аденинов.

ПолиА: (A)₄₀₀(SEQ ID NO:34)

45 ПолиА: (A)₂₀₀₀(SEQ ID NO:35)

Gly/Ser (SEQ ID NO:38): эта последовательность может охватывать 1-10 повторяющихся звеньев «Gly Gly Gly Ser»

GGGSGGGSGG GSGGSGGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGGS

В одном воплощении CLL-1-CAR может включать один или больше, например, один, два или три, CDR варибельного домена тяжелой цепи и/или один или больше, например, один, два или три, CDR варибельного домена легкой цепи или варибельную тяжелую цепь (VH) или варибельную легкую цепь (VL) анти-CLL-1 (CLEC12A) антитела, раскрытого в публикации PCT WO2014/051433, полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки.

Фрагменты CAR csFv можно клонировать в лентивирусные векторы для создания конструкции полноразмерного CAR в одной кодирующей рамке и с использованием промотора EF1-альфа для экспрессии (SEQ ID NO: 11).

Конструкция CAR может включать линкер Gly/Ser, имеющий одну или несколько из следующих последовательностей: GGGGS (SEQ ID NO:25); охватывающую 1-6 повторяющихся звеньев «Gly Gly Gly Gly Ser», например, GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 26); GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 27); GGGGSGGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 28); GGGGS (SEQ ID NO: 29); или охватывающую 1-10 повторяющихся звеньев «Gly Gly Gly Ser», например, GGGSGGGSGG GSGGGSGGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 38). В воплощениях конструкция CAR включает последовательность поли(A), например, последовательность, охватывающую 50-5000 или 100-5000 аденинов (например, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 35), или последовательность, охватывающую 50-5000 тиминов (например, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32). С другой стороны, конструкция CAR может включать, например, линкер, включающий последовательность GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 486).

Биспецифические CAR

В одном воплощении молекула полиспецифического антитела представляет собой молекулу биспецифического антитела. Биспецифическое антитело имеет специфичность в отношении не более чем двух антигенов. Молекула биспецифического антитела характеризуется последовательностью первого варибельного домена иммуноглобулина, который имеет специфичность связывания в отношении первого эпитопа, и последовательностью второго варибельного домена иммуноглобулина, который имеет специфичность связывания в отношении второго эпитопа. В одном воплощении первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, например, одном и том же белке (или субъединице полимерного белка). В одном воплощении первый и второй эпитопы перекрываются. В одном воплощении первый и второй эпитопы не перекрываются. В одном воплощении первый и второй эпитопы находятся в различных антигенах, например, различных белках (или различных субъединицах полимерного белка). В одном воплощении молекула биспецифического антитела включает последовательность варибельного домена тяжелой цепи и последовательность варибельного домена легкой цепи, которые имеют специфичность связывания в отношении первого эпитопа, и последовательность варибельного домена тяжелой цепи и последовательность варибельного домена легкой цепи, которые имеют специфичность связывания в отношении второго эпитопа. В одном воплощении молекула биспецифического антитела включает половину антитела, имеющую специфичность связывания в отношении первого эпитопа, и половину антитела, имеющую специфичность связывания в отношении второго эпитопа. В одном воплощении молекула биспецифического антитела включает половину антитела или ее фрагмент, имеющие специфичность связывания в отношении первого эпитопа, и половину антитела или ее фрагмент, имеющие специфичность связывания в отношении второго эпитопа. В одном воплощении молекула биспецифического антитела включает

scFv или его фрагмент, имеющие специфичность связывания в отношении первого эпитопа, и scFv или его фрагмент, имеющие специфичность связывания в отношении второго эпитопа.

В некоторых воплощениях молекула антитела является молекулой

- 5 полиспецифического (например, биспецифического или триспецифического) антитела. Протоколы для получения молекул биспецифических или триспецифических антител известны в технике, включая, но не ограничиваясь перечисленным, например, подход «застежка-кнопка», описанный, например, в US 5731168; спаривание Fc с использованием электростатического взаимодействия, описанное, например, в WO 09/089004, WO 06/106905 и WO 2010/129304; образование гетеродимера доменами, сконструированными с обменом цепей (SEED), описанное, например, в WO 07/110205; обмен
- 10 антигенсвязывающими фрагментами Fab, описанный, например, в WO 08/119353, WO 2011/131746 и WO 2013/060867; конъюгирование двух антител, например, путем сшивания антител, с образованием биспецифической структуры с использованием
- 15 гетеробифункционального реагента, имеющего аминную реакционную группу и сульфгидрильную реакционную группу, описанное, например, в US 4433059; протоколы детерминант биспецифических антител, полученных рекомбинацией половин антител (пар тяжелая-легкая цепь или Fab) из различных антител через цикл восстановления и окисления дисульфидных связей между двумя тяжелыми цепями, как описано, например,
- 20 в US 4444878; трифункциональных антител, например, трех Fab'-фрагментов, сшитых через сульфгидрильные реакционные группы, описанный, например, в US 5273743; биосинтетических связывающих белков, например, пары scFv, сшитых по С-концевым хвостам, предпочтительно, через химическое сшивание по дисульфидным или аминным реакционным группам, как описано, например, в US 5534254; бифункциональных
- 25 антител, например, Fab-фрагментов с различными специфичностями связывания, димеризованных через лейциновые молнии (например, c-fos и c-jun), в которых заменен константный домен, как описано, например, в US 5582996; биспецифических и олигоспецифических моно- и олиговалентных рецепторов, например, участков VH-CH1 двух антител (двух Fab-фрагментов), соединенных через полипептидный спейсер между
- 30 участком CH1 одного антитела и участком VH другого антитела, типично с ассоциированными легкими цепями, как описано, например, в US 5591828; биспецифических конъюгатов ДНК-антитело, например, от сшивания антител или Fab-фрагментов через двухцепочечный отрезок ДНК, как описано, например, в US 5635602; биспецифических слитых белков, например, экспрессирующей конструкции, содержащей
- 35 два scFv с гидрофильным спиральным пептидным линкером между ними и полным константным участком, как описано, например, в US 5637481; поливалентных и полиспецифических связывающих белков, например, димера полипептидов, имеющих первый домен со связывающим участком варибельного домена тяжелой цепи Ig и второй домен со связывающим участком варибельного домена легкой цепи Ig, обычно
- 40 называемых диателами (структуры более высокого порядка также охватываются как создающие биспецифические, триспецифические или тетраспецифические молекулы, как описано, например, в US 5837242; конструкций минител с соединенными VL и VH цепями, дополнительно соединенными пептидными спейсерами с шарнирным участком антитела и участком CD3, которые могут быть димеризованы с образованием
- 45 биспецифических/поливалентных молекул, как описано, например, в US 5837821; VH и VL доменов, соединенных коротким пептидным линкером (например, в 5 или 10 аминокислот) или без линкера вовсе в любой ориентации, которые могут образовывать димеры с образованием биспецифических диател, тримеры и тетрамеры, как описано,

например, в US 5844094; нити VH-доменов (или VL-доменов в членах семейства), соединенных пептидными связями со сшивающими группами по С-концу, дополнительно ассоциированных с VL-доменами, с образованием ряда FV (или scFv), как описано, например, в US 5864019; и одноцепочечные связывающие полипептиды как с VH-, так и с VL-доменом, соединенными через пептидный линкер, объединяют в поливалентные структуры через нековалентное или химическое сшивание с образованием, например, гомобивалентных, гетеробивалентных, тривалентных и тетравалентных структур, с использованием формата типа двух scFv или диател, как описано, например, в US 5869620. Другие примеры полиспецифических и биспецифических молекул и способы их получения находят, например, в US5910573, US5932448, US5959083, US5989830, US6005079, US6239259, US6294353, US6333396, US6476198, US6511663, US6670453, US6743896, US6809185, US6833441, US7129330, US7183076, US7521056, US7527787, US7534866, US7612181, US2002004587A1, US2002076406A1, US2002103345A1, US2003207346A1, US2003211078A1, US2004219643A1, US2004220388A1, US2004242847A1, US2005003403A1, US2005004352A1, US2005069552A1, US2005079170A1, US2005100543A1, US2005136049A1, US2005136051A1, US2005163782A1, US2005266425A1, US2006083747A1, US2006120960A1, US2006204493A1, US2006263367A1, US2007004909A1, US2007087381A1, US2007128150A1, US2007141049A1, US2007154901A1, US2007274985A1, US2008050370A1, US2008069820A1, US2008152645A1, US2008171855A1, US2008241884A1, US2008254512A1, US2008260738A1, US2009130106A1, US2009148905A1, US2009155275A1, US2009162359A1, US2009162360A1, US2009175851A1, US2009175867A1, US2009232811A1, US2009234105A1, US2009263392A1, US2009274649A1, EP346087A2, WO0006605A2, WO02072635A2, WO04081051A1, WO06020258A2, WO2007044887A2, WO2007095338A2, WO2007137760A2, WO2008119353A1, WO2009021754A2, WO2009068630A1, WO9103493A1, WO9323537A1, WO9409131A1, WO9412625A2, WO9509917A1, WO9637621A2, WO9964460A1.

Перечисленные выше заявки полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

В каждом антителе или фрагменте антитела (например, scFv) молекулы биспецифического антитела VH может располагаться выше или ниже VL. В некоторых воплощениях верхнее антитело или фрагмент антитела (например, scFv) выстраивают в ряд с его VH (VH₁) выше его VL (VL₁), и нижнее антитело или фрагмент антитела (например, scFv) выстраивают в ряд с его VL (VL₂) выше его VH (VH₂), так что вся молекула биспецифического антитела имеет аранжировку VH₁-VL₁-VL₂-VH₂. В других воплощениях верхнее антитело или фрагмент антитела (например, scFv) выстраивают в ряд с его VL (VL₁) выше его VH (VH₁), и нижнее антитело или фрагмент антитела (например, scFv) выстраивают в ряд с его VH (VH₂) выше его VL (VL₂), так что вся молекула биспецифического антитела имеет аранжировку VL₁-VH₁-VH₂-VL₂.

Необязательно между двумя антителами или фрагментами антител (например, scFv), располагается линкер, например, между VL₁ и VL₂, если конструкция выстроена в виде VH₁-VL₁-VL₂-VH₂, или между VH₁ и VH₂, если конструкция выстроена в виде VL₁-VH₁-VH₂-VL₂. Линкер может представлять собой линкер, описанный в настоящем описании, например, линкер (Gly₄-Ser)_n, где n равен 1, 2, 3, 4, 5 или 6, предпочтительно 4 (SEQ ID NO: 64). Как правило, линкер между двумя scFv должен быть достаточно длинным для того, чтобы избежать ошибочного спаривания между доменами двух scFv. Необязательно линкер располагается между VL и VH первого scFv. Необязательно линкер располагается между VL и VH второго scFv. В конструкциях, в которых имеется

несколько линкеров, любые два или больше линкеров могут быть одинаковыми или различными. Соответственно, в некоторых воплощениях биспецифический CAR включает VL, VH и, необязательно, один или больше линкеров в ряду, как описано в настоящем описании.

- 5 В одном аспекте молекула биспецифического антитела характеризуется первой последовательностью варибельного домена иммуноглобулина, например, scFv, которая имеет специфичность связывания в отношении CLL-1, например, включает scFv, описанный в настоящем описании, например, описанный в таблице 2, или включает CDR легкой цепи и/или CDR тяжелой цепи из CLL-1-scFv, описанного в настоящем описании, и второй последовательностью варибельного домена иммуноглобулина, например, scFv, которая имеет специфичность связывания в отношении второго эпитопа в другом антигене. В некоторых аспектах вторая последовательность варибельного домена иммуноглобулина имеет специфичность связывания в отношении антигена, экспрессированного на клетках AML, например, антигена иного, чем CLL-1. Например, 15 вторая последовательность варибельного домена иммуноглобулина имеет специфичность связывания в отношении CD33. Как другой пример, вторая последовательность варибельного домена иммуноглобулина имеет специфичность связывания в отношении FLT3. Например, вторая последовательность варибельного домена иммуноглобулина имеет специфичность связывания в отношении фолатного рецептора бета. В некоторых аспектах вторая последовательность варибельного домена иммуноглобулина имеет специфичность связывания в отношении антигена, экспрессированного на В-клетках, например, CD19, CD20, CD22 или ROR1.

Химерный TCR

- В одном аспекте антитела к CLL-1 и фрагменты антител по настоящему изобретению 25 (например, описанные в таблице 2) могут быть привиты на один или несколько константных доменов цепи Т-клеточного рецептора («TCR»), например, цепи TCR-альфа или TCR-бета, для создания химерного TCR, который специфически связывается с CLL-1. Без связи с какой-либо теорией, полагают, что химерные TCR будут передавать сигнал через комплекс TCR после связывания антигена. Например, CLL-1-scFv, раскрытый в настоящем описании, можно привить на константный домен, например, 30 по меньшей мере часть внеклеточного константного домена, трансмембранный домен и цитоплазматический домен цепи TCR-альфа, например, цепи TCR-альфа и/или цепи TCR-бета. Как другой пример, фрагмент антитела к CLL-1, например, VL домен, описанный в настоящем описании, можно привить на константный домен цепи TCR-альфа, и фрагмент антитела к CLL-1, например, VH домен, описанный в настоящем описании, можно привить на константный домен цепи TCR-бета (или альтернативно, VL домен можно привить на константный домен цепи TCR-бета, и VH домен можно привить к цепи TCR-альфа). Как другой пример, CDR антитела к CLL-1 или фрагмент антитела, например, CDR антитела к CLL-1 или фрагмента антитела, описанные в 40 таблицах 3, 4, 5, 6, 7 и 8, можно привить к цепи TCR-альфа и/или бета-цепи для создания химерного TCR, который специфически связывается с CLL-1. Например, LCDR, раскрытые в настоящем описании, можно привить на варибельный домен цепи TCR-альфа, и HCDR, раскрытые в настоящем описании, можно привить на варибельный домен цепи TCR-бета, или наоборот. Такие химерные TCR можно получить способами, известными в технике (см., например, Willemsen RA et al., Gene Therapy, 2000; 7: 1369-1377; Zhang T. et al., Cancer Gene Ther., 2004; 11: 487-496; Aggen et al., Gene Ther., 2012, Apr; 19(4): 365-74).

Трансмембранный домен

Что касается трансмембранного домена, в различных воплощениях можно создать CAR, включающий трансмембранный домен, который соединен с внеклеточным доменом CAR. Трансмембранный домен может включать одну или больше дополнительных аминокислот, соседних с трансмембранным участком, например, одну или больше аминокислот, ассоциированных с внеклеточным участком белка, из которого который трансмембранный белок получают (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и до 15 аминокислот внеклеточного участка), и/или одну или больше дополнительных аминокислот, ассоциированных с внутриклеточным участком белка, из которого получен трансмембранный белок (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и до 15 аминокислот внутриклеточного участка). В одном аспекте трансмембранный домен является доменом, который ассоциирован с одним из других доменов, которые используются в CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен можно выбрать или модифицировать путем аминокислотной замены для того, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами одних и тех же или различных поверхностных мембранных белков, например, для минимизации взаимодействий с другими членами рецепторного комплекса. В одном аспекте трансмембранный домен способен к гомодимеризации с другим CAR на поверхности клетки CART. В другом аспекте аминокислотная последовательность трансмембранного домена может быть модифицирована или заменена так, чтобы минимизировать взаимодействия со связывающими доменами нативного партнера по связыванию, присутствующего в той же CART.

Трансмембранный домен можно получить или из природного или из рекомбинантного источника. Когда источник является природным, домен можно получить из любого мембрансвязанного или трансмембранного белка. В одном аспекте трансмембранный домен способен передавать сигнал к внутриклеточному(ым) домену(ам), всякий раз, когда CAR связан с мишенью. Трансмембранный домен для определенного применения в настоящем изобретении может включать по меньшей мере трансмембранный(е) участок(ки), например, цепи альфа, бета или дзета Т-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8 (например, CD8-альфа, CD8-бета), CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. В некоторых воплощениях трансмембранный домен может включать по меньшей мере трансмембранный(е) участок(ки) костимулирующей молекулы, например, молекулы ГКГС I класса, белки рецептора TNF, иммуноглобулиноподобные белки, цитокиновые рецепторы, интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM), активирующие рецепторы NK-клеток, BTLA, лиганд Toll-рецептора, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRP1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (тактильный), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a и лиганд, который специфически связывается с CD83.

В некоторых случаях трансмембранный домен может присоединяться к внеклеточному участку CAR, например, антигенсвязывающему домену CAR, через шарнир, например, шарнир из человеческого белка. Например, в одном воплощении

шарнир может представлять собой шарнир человеческого Ig (иммуноглобулина), например, шарнир IgG4, или шарнир CD8. В одном воплощении шарнир или спейсер включает (например, состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В одном аспекте трансмембранный домен включает (например, состоит из)

5 трансмембранный домен SEQ ID NO: 6.

В одном аспекте шарнир или спейсер включает шарнир IgG4. Например, в одном воплощении шарнир или спейсер включает шарнир аминокислотную последовательность
 ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI
 10 SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
 PVLDSDDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKGM (SEQ
 ID NO: 3). В некоторых воплощениях шарнир или спейсер включает шарнир,
 кодированный нуклеотидной последовательностью GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCT
 GCGCCCTTGCCCTGCGCCCGAGTTCCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCC
 15 CCAAGCCCAAGGACACCTGTATGATCAGCCGGACCCCGAGGTGACCTGTGTGGTG
 GTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT
 GGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGGGAGGAGCAGTTCAATAGCACCTAC
 CGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATA
 CAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCA
 20 AGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCCAAGAG
 GAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAG
 CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACC
 ACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCCGGCTGACCGTG
 GACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGC
 25 CCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG (SEQ
 ID NO: 14).

В одном аспекте шарнир или спейсер включает шарнир IgD. Например, в одном воплощении шарнир или спейсер включает шарнир аминокислотной последовательности
 RWPEPKAQASSVPTAQPQAEGLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERET
 30 KTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTG
 GVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAQAP
 VKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGST
 TFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYSYVTDH (SEQ ID NO:4).

В некоторых воплощениях шарнир или спейсер включает шарнир, кодированный
 35 нуклеотидной последовательностью AGGTGGCCCGAAAGTCCCAAGGCCAGGCATC
 TAGTGTTCCTACTGCACAGCCCCAGGCAGAAAGGCAGCCTAGCCAAAGCTACTACTG
 CACCTGCCACTACGCGCAATACTGGCCGTGGCGGGGAGGAGAGAGAAAAGGAGAA
 AGAGAAAGAAGAACAGGAAGAGAGGGAGACCAAGACCCCTGAATGTCCATCCCAT
 ACCCAGCCGCTGGGCGTCTATCTCTTGACTCCCGCAGTACAGGACTTGTGGCTTAGA
 40 GATAAGGCCACCTTTACATGTTTCGTCGTGGGCTCTGACCTGAAGGATGCCCATTTG
 ACTTGGGAGGTTGCCGGAAGGTACCCACAGGGGGGGTTGAGGAAGGGTTGCTGG
 AGCGCCATTCCAATGGCTCTCAGAGCCAGCACTCAAGACTCACCTTCCGAGATCCC
 TGTGGAACGCCGGGACCTCTGTACATGTACTCTAAATCATCCTAGCCTGCCCCCAC
 AGCGTCTGATGGCCCTTAGAGAGCCAGCCGCCCAGGCACCAAGCTTAGCCTG
 45 AATCTGCTCGCCAGTAGTGATCCCCAGAGGCCGCCAGCTGGCTCTTATGCGAAGTG
 TCCGGCTTTAGCCCGCCCAACATCTTGCTCATGTGGCTGGAGGACCAGCGAGAAGT
 GAACACCAGCGGCTTCGCTCCAGCCCGGCCCCACCCAGCCGGGTTCTACCACATT
 CTGGGCCTGGAGTGTCTTAAGGGTCCCAGCACCACTAGCCCCAGCCAGCCACAT

ACACCTGTGTTGTGTCCCATGAAGATAGCAGGACCCTGCTAAATGCTTCTAGGAGTC
TGGAGGTTTCCTACGTGACTGACCATT (SEQ ID NO:15).

В одном аспекте трансмембранный домен может быть рекомбинантным, и в таком случае он будет включать преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В одном аспекте в каждом конце рекомбинантного домена могут быть обнаружены триплет фенилаланина, триптофана и валина.

Необязательно короткий олиго- или полипептидный линкер от 2 до 10 аминокислот в длину может образовывать связь между трансмембранным доменом и цитоплазматическим участком CAR. Дублет глицин-серин предоставляет особенно подходящий линкер. Например, в одном аспекте линкер включает аминокислотную последовательность GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 5). В некоторых воплощениях линкер кодирован нуклеотидной последовательностью GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC (SEQ ID NO: 16).

В одном аспекте шарнир или спейсер включает шарнир KIR2DS2.

Цитоплазматический домен

Цитоплазматический домен или участок CAR по настоящему изобретению включает внутриклеточный сигнальный домен. Внутриклеточный сигнальный домен, как правило, ответственен за активацию по меньшей мере одной из естественных эффекторных функций иммунной клетки, в которую введен CAR.

Примеры внутриклеточных сигнальных доменов для применения в CAR по изобретению включают цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора (TCR) и корецепторы, которые действуют сообща для инициации сигнальной трансдукции после сцепления антигена с рецептором, а также любое производное или вариант таких последовательностей и любую рекомбинантную последовательность, которая имеет такую же функциональную способность.

Известно, что сигналы, генерированные через один TCR, являются недостаточными для полной активации Т-клетки, и что также требуется вторичный и/или костимулирующий сигнал. Таким образом, можно сказать, что активация Т-клетки опосредуется двумя различными классами цитоплазматических сигнальных последовательностей: последовательностями, которые иницируют антигензависимую первичную активацию через TCR (первичные внутриклеточные сигнальные домены), и последовательностями, которые действуют антигеннезависимо, обеспечивая вторичный или костимулирующий сигнал (вторичный цитоплазматический сигнальный домен, например, костимулирующий домен).

Первичный сигнальный домен регулирует первичную активацию комплекса TCR или путем стимуляции или путем ингибирования. Первичные внутриклеточные сигнальные домены, которые действуют путем стимуляции, содержат сигнальные мотивы, которые известны как иммунорецепторные активирующие мотивы на основе тирозина или ITAM.

Примеры ITAM, содержащих первичные внутриклеточные сигнальные домены, которые особенно используются в изобретении, включают ITAM TCR-дзета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (также известный как «ICOS»), FcεRI, DAP10, DAP12 и CD66d. В одном воплощении CAR по изобретению включает внутриклеточный сигнальный домен, например, первичный сигнальный домен CD3-дзета.

В одном воплощении первичный сигнальный домен включает модифицированный домен ITAM, например, мутированный домен ITAM, который имеет измененную (например, увеличенную или уменьшенную) активность по сравнению с нативным

доменом ITAM. В одном воплощении первичный сигнальный домен включает модифицированный ITAM-содержащий первичный внутриклеточный сигнальный домен, например, оптимизированный и/или усеченный ITAM-содержащий первичный внутриклеточный сигнальный домен. В одном воплощении первичный сигнальный домен включает одни, два, три, четыре или больше мотивов ITAM.

Другие примеры молекул, содержащих первичный внутриклеточный сигнальный домен, которые имеют особое применение в изобретении, включают молекулы DAP10, DAP12 и CD32.

Внутриклеточный сигнальный домен CAR может включать первичный сигнальный домен, например, CD3-дзета сигнальный домен сам по себе или может быть объединен в любым(и) другим(и) нужным(и) внутриклеточным(и) сигнальным(и) доменом(ами), применимым(и) в контексте CAR по изобретению. Например, внутриклеточный сигнальный домен CAR может включать первичный сигнальный домен, например, часть цепи CD3-дзета, и костимулирующий сигнальный домен. Костимулирующий сигнальный домен относится к части CAR, включающей внутриклеточный домен костимулирующей молекулы. Костимулирующая молекула представляет собой молекулу клеточной поверхности иную, чем антигенный рецептор или его лиганды, которая требуется для эффективной реакции лимфоцитов на антиген. Примеры таких молекул включают молекулу ГКГС класса I, белки рецептора TNF, иммуноглобулиноподобные белки, цитокиновые рецепторы, интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM), активирующие рецепторы NK-клетки, лиганд Toll-рецептора, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (тактильный), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a и лиганд, который специфически связывается с CD83, и т.п.. Например, показано, что костимуляция CD27 усиливает экспансию, эффекторную функцию и выживаемость человеческих клеток CART *in vitro* и увеличивает стойкость и противоопухолевую активность *in vivo* (Song et al., Blood, 2012, 119(3): 696-706). Внутриклеточные сигнальные последовательности в цитоплазматической части CAR по изобретению могут соединяться друг с другом произвольно или в определенном порядке. Необязательно короткий олиго- или полипептидный линкер, например, длиной от 2 до 10 аминокислот (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот), может образовывать связь между внутриклеточными сигнальными последовательностями. В одном воплощении в качестве подходящего линкера можно использовать одну аминокислоту, например, аланин, глицин.

В одном аспекте внутриклеточный сигнальный домен создают как включающий два или больше, например, 2, 3, 4, 5 или больше, костимулирующих сигнальных доменов. В одном воплощении два или больше, например, 2, 3, 4, 5 или больше, костимулирующих сигнальных доменов разделены линкерной молекулой, например, линкерной молекулой, описанной в настоящем описании. В одном воплощении внутриклеточный сигнальный домен включает два костимулирующих домена. В некоторых воплощениях линкерная молекула представляет собой глициновый остаток. В некоторых воплощениях линкер

представляет собой аланиновый остаток.

В одном аспекте внутриклеточный сигнальный домен создают как включающий сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен CD28. В одном аспекте внутриклеточный сигнальный домен создают как включающий сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен 4-1BB. В одном аспекте сигнальный домен CD3-дзета представляет собой сигнальный домен SEQ ID NO: 9 (мутантный CD3-дзета) или SEQ ID NO: 10 (человеческий CD3-дзета дикого типа).

В одном аспекте внутриклеточный сигнальный домен создают как включающий сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен CD27. В одном аспекте сигнальный домен CD27 включает аминокислотную последовательность QRRKYRSNKGESPVEPA EPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP (SEQ ID NO: 8). В одном аспекте сигнальный домен CD27 кодируется нуклеотидной последовательностью AGGAGTAAGAGGAGC AGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCG CAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC (SEQ ID NO: 19).

В одном аспекте внутриклеточный сигнальный домен создают как включающий сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен CD28. В одном аспекте сигнальный домен CD28 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 482. В одном аспекте сигнальный домен CD28 кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 483.

В одном аспекте внутриклеточный сигнальный домен создают как включающий сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен ICOS. В одном аспекте сигнальный домен ICOS включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 484. В одном аспекте сигнальный домен ICOS кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 485.

В одном аспекте CAR-экспрессирующая клетка, описанная в настоящем описании, может дополнительно включать второй CAR, например, CAR, который включает другой антигенсвязывающий домен, например, для той же мишени (CLL-1) или другой мишени (например, CD123, CD33, CD34, FLT3 или фолатного рецептора бета). В одном воплощении второй CAR включает антигенсвязывающий домен к мишени, экспрессированной в клетках острого миелоидного лейкоза, таких как, например, CD123, CD33, CD34, FLT3 или фолатного рецептора бета. В одном воплощении CAR-экспрессирующая клетка включает первый CAR, который специфически связывает первый антиген и включает внутриклеточный сигнальный домен, имеющий костимулирующий сигнальный домен, но не первичный сигнальный домен, и второй CAR, который специфически связывает второй отличный от первого антиген и включает внутриклеточный сигнальный домен, имеющий первичный сигнальный домен, но не костимулирующий сигнальный домен. Без желания привязываться к теории, размещение костимулирующего сигнального домена, например, 4-1BB, CD28, CD27, ICOS или OX-40, в первом CAR и первичного сигнального домена, например, CD3-дзета, во втором CAR может ограничить активность CAR для клеток, где экспрессируется обе мишени. В одном воплощении CAR-экспрессирующая клетка включает первый CLL-1-CAR, который включает CLL-1-связывающий домен, трансмембранный домен и костимулирующий домен, и второй CAR, который специфически связывает антиген иной, чем CLL-1 (например, антиген, экспрессированный на клетках AML, например, CD123, CD33, CD34, FLT3 или фолатного рецептора бета), и включает антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и первичный сигнальный домен. В другом воплощении CAR-экспрессирующая клетка включает первый CLL-1-CAR,

который включает CLL-1-связывающий домен, трансмембранный домен и первичный сигнальный домен, и второй CAR, который специфически связывает антиген иной, чем CLL-1 (например, антиген, экспрессированный на клетках AML, например, CD123, CD33, CD34, FLT3 или фолатного рецептора бета), и включает антигенсвязывающий домен для антигена, трансмембранный домен и костимулирующий домен.

В одном воплощении CAR-экспрессирующая клетка включает CLL-1-CAR, описанный в настоящем описании, и ингибирующий CAR. В одном воплощении ингибирующий CAR включает антигенсвязывающий домен, который связывает антиген, находящийся на здоровых клетках, но не на раковых клетках, например, здоровых клетках, которые также экспрессируют CLL-1. В одном воплощении ингибирующий CAR включает антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен ингибирующей молекулы. Например, внутриклеточный сигнальный домен ингибирующей молекулы может представлять собой внутриклеточный домен PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, ГКГС класса I, ГКГС класса II, GAL9, аденозин и TGFR-бета.

В одном воплощении, когда CAR-экспрессирующая клетка включает два или больше различных CAR, антигенсвязывающие домены различных CAR могут быть такими, что антигенсвязывающие домены не взаимодействуют друг с другом. Например, клетка, экспрессирующая первый и второй CAR, может иметь антигенсвязывающий домен первого CAR, например, фрагмент, например, scFv, который не образует ассоциацию с антигенсвязывающим доменом второго CAR, например, антигенсвязывающий домен второго CAR представляет собой VHH.

В некоторых воплощениях антигенсвязывающий домен включает антигенсвязывающие однодоменные молекулы (SDAB), определяющие комплементарность участки которых являются частью одного полипептидного домена. Примеры включают, но не ограничиваются перечисленным, вариabельные домены тяжелой цепи, связывающие молекулы, по природе лишенные легких цепей, отдельные домены, образованные от обычных 4-цепочечных антител, сконструированные домены и однодоменные каркасы иные, чем каркасы, образованные от антител. Молекулы SDAB могут быть из любых молекул, известных в технике, или любых будущих однодоменных молекул. Молекулы SDAB можно получить от любого вида, включая, но не ограничиваясь перечисленным, мышь, человека, верблюда, ламу, рыбу, акулу, козу, кролика и корову. Этот термин также включает встречающиеся в природе молекулы однодоменных антител вида иного, чем камелиды и акулы.

В одном аспекте молекулу SDAB можно получить из вариabельного участка иммуноглобулина, находящегося в рыбе, такого как, например, который получают из изотипа иммуноглобулина, известного как новый антигенный рецептор (NAR), обнаруженного в сыворотке акулы. Способы получения однодоменных молекул, образованных из вариabельного участка NAR («IgNARs»), описаны в WO 03/014161 и Streltsov (2005), Protein Sci., 14: 2901-2909.

Согласно другому аспекту молекула SDAB представляет собой встречающуюся в природе однодоменную антигенсвязывающую молекулу, известную как тяжелоцепочечная, лишенная легких цепей. Такие однодоменные молекулы раскрываются в WO 9404678 и Hamers-Casterman C. et al. (1993), Nature, 363: 446-448, например. Для ясности, такой вариabельный домен, образованный от тяжелоцепочечной молекулы, по природе лишенной легких цепей, известен в данном случае как VHH или

нанотело, для того, чтобы отличить его от обычного VH четырехцепочечных иммуноглобулинов. Такую VHN молекулу можно получить от вида верблюдовых, например, верблюда, ламы, дромедара, альпаки и гуанако. Кроме верблюдовых, продуцировать тяжелоцепочечные молекулы, по природе лишенные легких цепей, могут другие виды; такие VHN входят в объем изобретения.

Молекулы SDAB могут быть рекомбинантными, с присоединенными CDR, гуманизированными, камелизированными, деиммунизированными и/или генерированными *in vitro* (например, выбранные с помощью фагового дисплея).

Также обнаружено, что существуют клетки, имеющие несколько химерных внедренных в мембрану рецепторов, включающих антигенсвязывающий домен, в которых могут быть нежелательными взаимодействия между антигенсвязывающими доменами рецепторов, например, поскольку они ингибирует способность одного или нескольких антигенсвязывающих доменов связывать свой родственный антиген.

Соответственно, в настоящем описании раскрываются клетки, имеющие первый и второй не встречающиеся в природе локализованные в мембране химерные рецепторы, включающие антигенсвязывающие домены, которые минимизируют такие взаимодействия. В настоящем описании также раскрываются нуклеиновые кислоты, кодирующие первый и второй не встречающиеся в природе локализованные в мембране химерные рецепторы, включающие антигенсвязывающие домены, которые

минимизируют такие взаимодействия, а также способы получения и применения таких клеток и нуклеиновых кислот. В одном воплощении антигенсвязывающий домен одного из указанных первого и второго не встречающихся в природе локализованных в мембране химерных рецепторов, включает scFv, и другой включает одно-VH домен, например, верблюда, акулы, или одно-VH домен миноги, или одно-VH домен, полученный из человеческой или мышьиной последовательности.

В некоторых воплощениях изобретение относится к первому и второму CAR, где антигенсвязывающий домен одного из указанного первого CAR и указанного второго CAR не включает вариабельный легкий домен и вариабельный тяжелый домен. В некоторых воплощениях антигенсвязывающий домен одного из указанного первого CAR и указанного второго CAR представляет собой scFv, а другой не является scFv. В некоторых воплощениях антигенсвязывающий домен одного из указанного первого CAR и указанного второго CAR включает одно-VH домен, например, верблюда, акулы, или одно-VH домен миноги, или одно-VH домен, полученный из человеческой или мышьиной последовательности. В некоторых воплощениях антигенсвязывающий домен одного из указанного первого CAR и указанного второго CAR включает нанотело. В некоторых воплощениях антигенсвязывающий домен одного из указанного первого CAR и указанного второго CAR включает камелидный VHN домен.

В некоторых воплощениях антигенсвязывающий домен одного из указанного первого CAR и указанного второго CAR включает scFv, и другой включает одно-VH домен, например, верблюда, акулы, или одно-VH домен миноги, или одно-VH домен, полученный из человеческой или мышьиной последовательности. В некоторых воплощениях антигенсвязывающий домен одного из указанного первого CAR и указанного второго CAR включает scFv, и другой включает нанотело. В некоторых воплощениях антигенсвязывающий домен одного из указанного первого CAR и указанного второго CAR включает scFv, и другой включает камелидный VHN домен.

В некоторых воплощениях, при наличии на поверхности клетки, связывание антигенсвязывающего домена указанного первого CAR с его родственным антигеном по существу не ослабляется присутствием указанного второго CAR. В некоторых

воплощениях связывание антигенсвязывающего домена указанного первого CAR с его родственным антигеном в присутствии указанного второго CAR составляет 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% от связывания антигенсвязывающего домена указанного первого CAR с его родственным антигеном в отсутствие указанного второго CAR.

5 В некоторых воплощениях, при наличии на поверхности клетки, антигенсвязывающие домены указанного первого CAR и указанного второго CAR ассоциируются друг с другом слабее, чем если бы оба домена представляли собой scFv антигенсвязывающие домены. В некоторых воплощениях, при наличии на поверхности клетки, антигенсвязывающие домены указанного первого CAR и указанного второго CAR ассоциируются друг с другом на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% меньше, чем
10 если бы оба домена представляли собой scFv антигенсвязывающие домены.

В другом аспекте CAR-экспрессирующая клетка, описанная в настоящем описании, может дополнительно экспрессировать другой агент, например, агент, который усиливает активность CAR-экспрессирующей клетки. Например, в одном воплощении
15 агент может представлять собой агент, который подавляет ингибирующую молекулу. Ингибирующие молекулы, например, PD1, могут, в некоторых воплощениях, снижать способность CAR-экспрессирующей клетки подготавливать иммунную эффекторную реакцию. Примеры ингибирующих молекул включают PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA,
20 TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, ГКГС класса I, ГКГС класса II, GAL9, аденозин и TGFR-бета. В одном воплощении агент, который подавляет ингибирующую молекулу, включает первый полипептид, например, ингибирующую молекулу, ассоциированный со вторым полипептидом, который обеспечивает положительный сигнал для клетки, например,
25 внутриклеточный сигнальный домен, описанный в настоящем описании. В одном воплощении агент включает первый полипептид, например, ингибирующую молекулу, такую как PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, ГКГС
30 класса I, ГКГС класса II, GAL9, аденозин и TGFR-бета, или фрагмент любой из них (например, по меньшей мере часть внеклеточного домена любой из них), и второй полипептид, который представляет собой внутриклеточный сигнальный домен, описанный в настоящем описании (например, включающий костимулирующий домен (например, 4-1BB, CD27, ICOS или CD28, описанные в настоящем описании), и/или
35 первичный сигнальный домен (например, сигнальный домен CD3-дзета, описанный в настоящем описании). В одном воплощении агент включает первый полипептид PD1 или его фрагмент (например, по меньшей мере часть внеклеточного домена PD1) и второй полипептид внутриклеточного сигнального домена, описанного в настоящем описании (например, сигнальный домен CD28, описанный в настоящем описании, и/
40 или сигнальный домен CD3-дзета, описанный в настоящем описании). В воплощениях CAR-экспрессирующая клетка, описанная в настоящем описании, включает переключающий костимулирующий рецептор, например, описанный в WO 2013/019615, полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки. PD1 представляет собой ингибирующий член семейства рецепторов CD28, которое также включает CD28, CTLA-4, ICOS и BTLA. PD-1 экспрессируется на активированных В-клетках, Т-клетках и миелоидных клетках (Agata et al., 1996, Int. Immunol., 8: 765-75). Показано, что два лиганда для PD1 - PD-L1 и PD-L2 отрицательно регулируют активацию Т-клеток после связывания с PD1 (Freeman et al., 2000, J. Exp. Med., 192: 1027-34; Latchman et al., 2001,

Nat. Immunol., 2: 261-8; Carter et al., 2002, Eur. J. Immunol., 32: 634-43). PD-L1 обилие в раковых клетках человека (Dong et al., 2003, J. Mol. Med., 81: 281-7; Blank et al., 2005, Cancer Immunol. Immunother., 54: 307-314; Konishi et al., 2004, Clin. Cancer Res., 10: 5094). Иммунную супрессию можно реверсировать путем ингибирования локального взаимодействия PD1 с PD-L1.

В одном воплощении агент включает внеклеточный домен (ECD) ингибирующей молекулы, например, запрограммированной гибели 1 (PD1), который может быть слит с трансмембранным доменом и внутриклеточным сигнальным доменом, такими как 41BB и CD3-дзета (также называемым в настоящем описании PD1-CAR). В одном воплощении PD1-CAR, когда используется в комбинациях с CLL-1-CAR, описанным в настоящем описании, улучшает стойкость CAR-экспрессирующей клетки, например, Т-клетки или NK-клетки. В одном воплощении CAR представляет собой PD1-CAR, включающий внеклеточный домен PD1, указанный как подчеркнутый в SEQ ID NO: 24. В одном воплощении PD1-CAR включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

Malpvtalllplalllhaarppgwfldspdrpwnpptsfpallvvtgednatftcsfsntsesfvlwyrmspsnqtdklaafpedrs qpgqdcfrvrtqlpngrdfhmsvvrarrndsgtylcaislakpaqikeslraelrvterraevptahpspsprpagqfqlvtttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrff eeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreedyvldkrgrdpemggkprknpqeglynelqkdmaeyseigm kgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqlppr (SEQ ID NO:24).

В одном воплощении PD1-CAR включает аминокислотную последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 22).

pgwflldspdrpwnpptsfpallvvtgednatftcsfsntsesfvlwyrmspsnqtdklaafpedrsqpgqdcfrvrtqlpngrdf hmsvvrarrndsgtylcaislakpaqikeslraelrvterraevptahpspsprpagqfqlvtttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrff eeeeggcelrvkfsrsada paykqgqnqlynelnlgrreedyvldkrgrdpemggkprknpqeglynelqkdmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqlppr (SEQ ID NO:22).

В одном воплощении агент включает нуклеотидную последовательность, кодирующую PD1-CAR, например, PD1-CAR, описанный в настоящем описании. В одном воплощении нуклеотидная последовательность для PD1-CAR показана ниже, причем ниже в SEQ ID NO: 23 PD1-ECD подчеркнут.

atggccctccctgtcactgccctgcttctccccctgcactcctgtccacgccgctagaccacccggatggttctggactctccggat cggccgtggaatcccccaaccttctcaccggcactcttggttgactgagggcgataatgcgaccttcacgtgctcgttctccaacacctc cgaatcattcgtgctgaactggtaccgcatgagcccgtaaacagaccgacaagctcggcggttccgggaagatcggtcgcaaccgg gacaggattgtcggttccgcgtgactcaactgccgaatggcagagacttccacatgagcgtggtccgcgctaggcgaaacgactccggg acctacctgtgcggagccatctcgtggtcgctaaaggcccaaatcaaaagagagcttgaggggcgaactgagagtgaccgagcgagag ctgaggtgccaactgcacatccatccccatcgccctcgccgtcggggagtttcagaccctggtcacgacctccggcgccgcgcca ccgactccggcccaactatcgcgagccagccctgtcgtgagggcggaagcatgccgcctgccgcccggaggtgctgtgcataccc ggggattggacttcgcatgcgacatctacatttgggtcctctcgccggaactgtggcgtgctccttctgctcctgtgcatccctgtactg caagcggggtcggaaaaagcttctgtacatttcaagcagccctcatgaggcccggtgcaaacaccacaggaggaggacggttgcctctg ccggttccccgaagaggaagaaggaggtgagctgcgctgaagtctcccgagcgccgacgccccgcctataagcaggggcca gaaccagctgtacaacgaactgaactgggacggcggaagagtacgatgtgctggacaagggcgcgccggggacccccgaaatgg gcgggaagcctagaagaagaacctcaggaaggcctgtataacgagctgcagaaggacaagatggccgagggcctactccgaaattg ggatgaaggagagcggcgagggggaaaggggcacgacggcctgtaccaaggactgtccaccgccaccaaggacacatacagatgc cctgcacatgcaggcccttccccctgc (SEQ ID NO: 23).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к популяции CAR-экспрессирующих клеток, например, клеток CART или CAR-экспрессирующих NK-клеток. В некоторых воплощениях популяция CAR-экспрессирующих клеток включает

смесь клеток, экспрессирующих различные CAR. Например, в одном воплощении популяция CAR-экспрессирующих клеток (например, клеток CART или CAR-экспрессирующих NK-клеток) может включать первую клетку, экспрессирующую CAR, имеющий анти-CLL-1 связывающий домен, описанный в настоящем описании, и вторую клетку, экспрессирующую CAR, имеющий другой анти-CLL-1 связывающий домен, например, анти-CLL-1 связывающий домен, описанный в настоящем описании, который отличается от анти-CLL-1 связывающего домена в CAR, экспрессированном первой клеткой. Как другой пример, популяция CAR-экспрессирующих клеток может включать первую клетку, экспрессирующую CAR, который включает анти-CLL-1 связывающий домен, например, описанный в настоящем описании, и вторую клетку, экспрессирующую CAR, который включает антигенсвязывающий домен для мишени иной, чем CLL-1, например, CD123, CD33, CD34, FLT3 или фолатный рецептор бета). В одном воплощении популяция CAR-экспрессирующих клеток включает, например, первую клетку, экспрессирующую CAR, который включает первичный внутриклеточный сигнальный домен, и вторую клетку, экспрессирующую CAR, который включает вторичный сигнальный домен, например, костимулирующий сигнальный домен.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к популяции клеток, где по меньшей мере одна клетка в популяции экспрессирует CAR, имеющий анти-CLL-1 связывающий домен, описанный в настоящем описании, и вторая клетка экспрессирует другой агент, например, агент, который усиливает активность CAR-экспрессирующей клетки. Например, в одном воплощении агент может представлять собой агент, который подавляет ингибирующую молекулу. Ингибирующие молекулы, например, в некоторых воплощениях снижают способность CAR-экспрессирующей клетки подготавливать иммунную эффекторную реакцию. Примеры ингибирующих молекул включают PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, ГКГС класса I, ГКГС класса II, GAL9, аденозин и TGFR-бета. В одном воплощении агент, который подавляет ингибирующую молекулу, включает первый полипептид, например, ингибирующую молекулу, ассоциированный со вторым полипептидом, который обеспечивает положительный сигнал для клетки, например, внутриклеточный сигнальный домен, описанный в настоящем описании. В одном воплощении агент включает первый полипептид, например, ингибирующую молекулу, такую как PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, ГКГС класса I, ГКГС класса II, GAL9, аденозин и TGFR-бета, или фрагмент любой из них (например, по меньшей мере часть внеклеточного домена любой из них), и второй полипептид, который представляет собой внутриклеточный сигнальный домен, описанный в настоящем описании (например, включающий костимулирующий домен (например, 4-1BB, CD27, ICOS или CD28, описанные в настоящем описании), и/или первичный сигнальный домен (например, сигнальный домен CD3-дзета, описанный в настоящем описании)). В одном воплощении агент включает первый полипептид PD1 или его фрагмент (например, по меньшей мере часть внеклеточного домена PD1) и второй полипептид внутриклеточного сигнального домена, описанного в настоящем описании (например, сигнальный домен CD28, описанный в настоящем описании, и/или сигнальный домен CD3-дзета, описанный в настоящем описании).

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам, включающим введение

популяции CAR-экспрессирующих клеток (например, клеток CART или CAR-экспрессирующих NK-клеток), например, смеси клеток, экспрессирующих различные CAR, в комбинации с другим агентом, например, ингибитором киназы, таким как ингибитор киназы, описанный в настоящем описании. В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам, включающим введение популяции клеток, где по меньшей мере одна клетка в популяции экспрессирует CAR, имеющий противораковый ассоциированный антигенсвязывающий домен, описанный в настоящем описании, и вторая клетка экспрессирует другой агент, например, агент, который усиливает активность CAR-экспрессирующих клеток, в комбинации с другим агентом, например, ингибитором киназы, таким как ингибитор киназы, описанный в настоящем описании.

CAR рецептора природной клетки-киллера (NKR)

В одном воплощении молекула CAR, описанная в настоящем описании, включает один или больше компонентов рецептора природной клетки-киллера (NKR), посредством чего образуется NKR-CAR. Компонент NKR может представлять собой трансмембранный домен, шарнирный домен или цитоплазматический домен любого из следующих рецепторов природной клетки-киллера: иммуноглобулиноподобный рецептор клетки-киллера (KIR), например, KIR2DL1, KIR2DL2/L3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DL1/S1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR2DP1 и KIR3DP1; природный цитотоксический рецептор (NCR), например, NKp30, NKp44, NKp46; сигнальную молекулу активации лимфоцитов (SLAM) семейства рецепторов иммунных клеток, например, CD48, CD229, 2B4, CD84, NTB-A, CRACC, BLAME и CD2F-10; Fc-рецептор (FcR), например, CD16 и CD64; и рецепторы Ly49, например, LY49A, LY49C. Молекулы NKR-CAR, описанные в настоящем описании, могут взаимодействовать с адапторной молекулой или внеклеточным сигнальным доменом, например, DAP12. Примеры конфигураций и последовательностей молекул CAR, включающих компоненты NKR, описаны в публикации № WO2014/145252, включенной в настоящее описание в качестве ссылки.

Стратегии регуляции химерных антигенных рецепторов

Существует много способов, которыми можно регулировать активности CAR. В некоторых воплощениях регулируемый CAR (RCAR), где активность CAR можно регулировать, желателен для оптимизации безопасности и эффективности CAR-терапии. Например, индукцию апоптоза с использованием, например, каспазы, слитой с димеризованным доменом (см., например, Di et al., N. Engl. J. Med., 2011, Nov. 3; 365(18): 1673-1683), можно использовать как переключатель безопасности в CAR-терапии по настоящему изобретению. В другом примере CAR-экспрессирующие клетки могут также экспрессировать индуцируемую молекулу каспазы-9 (и-каспаза-9), которая после введения лекарственного средства димеризатора (например, римидусида (также называемого AP1903 (Bellicum Pharmaceuticals) или AP20187 (Ariad) ведет к активации каспазы-9 и апоптозу клеток. Молекула каспазы-9 содержит домен, связывающий химический индуктор димеризации (CID), который опосредует димеризацию в присутствии CID. Это приводит к индуцируемому и селективному истощению CAR-экспрессирующих клеток. В некоторых случаях молекула и-каспазы-9 кодируется молекулой нуклеиновой кислоты отдельно от CAR-кодирующего(их) вектора(ов). В некоторых случаях молекула и-каспазы-9 кодируется той же молекулой нуклеиновой кислоты, что и CAR-кодирующий вектор. Переключатель безопасности обеспечивает и-каспаза-9 для того, чтобы избежать какую-либо токсичность CAR-экспрессирующих клеток. См., например, Song et al. Cancer Gene Ther., 2008; 15(10): 667-75; Clinical Trial Id. No. NCT02107963; и Di Stasi et al., N. Engl. J. Med., 2011; 365: 1673-83.

Альтернативные стратегии регулирования CAR-терапии по настоящему изобретению включают использование небольших молекул или антител, которые дезактивируют или заглушают активность CAR, например, путем делеции CAR-экспрессирующих клеток, например, путем индукции антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC). Например, CAR-экспрессирующие клетки, описанные в

5 настоящем описании, также могут экспрессировать антиген, который узнается молекулами, способными индуцировать гибель клетки, например, ADCC или коплементиндуцированную гибель клетки. Например, CAR-экспрессирующие клетки, описанные в настоящем описании, также могут экспрессировать рецептор, способный

10 нацеливаться антителом или фрагментом антитела. Примеры таких рецепторов включают EPCAM, VEGFR, интегрины (например, $\alpha\beta3$, $\alpha4$, $\alpha1\beta3$, $\alpha4\beta7$, $\alpha5\beta1$, $\alpha\nu\beta3$, $\alpha\nu$), члены суперсемейства рецепторов TNF (например, TRAIL-R1, TRAIL-R2), рецептор PDGF, интерфероновый рецептор, фолатный рецептор, GPNMB, ICAM-1, HLA-DR, CEA, CA-125, MUC1, TAG-72, рецептор IL-6, 5T4, GD2, GD3, CD2, CD3, CD4, CD5, CD11, CD1

15 1a/LFA-1, CD15, CD18/ITGB2, CD19, CD20, CD22, CD23/IgE рецептор, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD41, CD44, CD51, CD52, CD62L, CD74, CD80, CD125, CD147/базигин, CD152/CTLA-4, CD154/CD40L, CD195/CCR5, CD319/SLAMF7 и EGFR и их усеченные варианты (например, варианты, сохраняющие один или больше внеклеточных эпитопов, но утрачивающие один или больше участков в цитоплазматическом домене). Например,

20 CAR-экспрессирующие клетки, описанные в настоящем описании, также могут экспрессировать усеченный рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), который утрачивает способность передавать сигнал, но сохраняет эпитоп, который узнается молекулой, способной индуцировать ADCC, например, цетуксимаб (ERBITUX®), так что введение цетуксимаба индуцирует ADCC и последующее истощение CAR-

25 экспрессирующих клеток (см., например, WO2011/056894 и Jonnalagadda et al., Gene Ther., 2013; 20(8), 853-860). Другая стратегия включает экспрессию комплекса высококомпактный маркер/суицидный ген, который объединяет эпитопы-мишени из антигенов как CD32, так и CD20 в CAR-экспрессирующих клетках, описанных в настоящем описании, который связывает ритуксимаб, приводя к селективному

30 истощению CAR-экспрессирующих клеток, например, путем ADCC (см., например, Philip et al., Blood, 2014; 124(8), 1277-1287). Другие способы истощения CAR-экспрессирующих клеток, описанных в настоящем описании, включают введение CAMPATH - моноклонального анти-CD52 антитела, которое селективно связывает и метит зрелые лимфоциты, например, CAR-экспрессирующие клетки, для деструкции,

35 например, путем индукции ADCC. В других воплощениях CAR-экспрессирующая клетка может быть селективно таргетирована с использованием CAR-лиганда, например, антиидиотипического антитела. В некоторых воплощениях антиидиотипическое антитело может вызывать активность эффекторных клеток, например, активности ADCC или ADC, посредством чего уменьшается число CAR-экспрессирующих клеток. В других

40 воплощениях CAR-лиганд, например, антиидиотипическое антитело, может быть соединено с агентом, который индуцирует киллинг клеток, например, токсином, посредством чего уменьшается число CAR-экспрессирующих клеток. С другой стороны, молекулы CAR сами могут иметь такую конфигурацию, что активность можно регулировать, например, включать и выключать, как описано ниже.

45 В некоторых воплощениях RCAR включает набор полипептидов, типично два в самых простых воплощениях, в которых компоненты стандартного CAR, описанного в настоящем описании, например, антигенсвязывающий домен и внутриклеточный сигнальный домен, распределены по отдельным полипептидам или членам. В некоторых

воплощениях набор полипептидов включает переключатель димеризации, который в присутствии димеризующей молекулы может соединять полипептиды один с другим, например, может соединять антигенсвязывающий домен с внутриклеточным сигнальным доменом. Дополнительное описание и примеры конфигураций таких регулируемых

5 CAR приводятся в настоящем описании и в международной публикации № WO 2015/090229, полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки.

В одном аспекте RCAR включает два полипептида или члена: 1) внутриклеточный сигнальный член, включающий внутриклеточный сигнальный домен, например, первичный внутриклеточный сигнальный домен, описанный в настоящем описании, и

10 первый переключающий домен; 2) антигенсвязывающий член, включающий антигенсвязывающий домен, например, который специфически связывает опухолевый антиген, описанный в настоящем описании, и второй переключающий домен.

Необязательно RCAR включает трансмембранный домен, описанный в настоящем описании. В одном воплощении трансмембранный домен может располагаться на

15 внутриклеточном сигнальном домене, на антигенсвязывающем домене или на обоих. (Если не указано иное, когда члены или элементы RCAR описываются в настоящем описании, порядок может быть такой, как описан, но включены также другие порядки. Иными словами, в одном воплощении порядок представляет собой набор как из текста, но в других воплощениях порядок может быть иным. Например, порядок элементов

20 на одной стороне трансмембранного участка может отличаться от примера, например, размещение переключающего домена относительно внутриклеточного сигнального домена может быть иным, например, обратным).

В одном воплощении первый и второй переключающие домены могут образовывать внутриклеточный или внеклеточный димеризующий переключатель. В одном

25 воплощении димеризации переключатель может представлять собой гомодимеризующий переключатель, например, когда первый и второй переключающие домены являются одинаковыми, или гетеродимеризующий переключатель, например, когда первый и второй переключающие домены отличаются один от другого.

В одном воплощении RCAR может включать «мультипереключатель».

Мультипереключатель может включать гетеродимеризующие переключающие домены или гомодимеризующие переключающие домены. Мультипереключатель включает

30 несколько, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 переключающих доменов, независимо на первом члене, например, антигенсвязывающем члене, и втором члене, например, внутриклеточном сигнальном члене. В одном воплощении первый член может включать

35 несколько первых переключающих доменов, например, переключающих доменов на основе FKBP, и второй член может включать несколько вторых переключающих доменов, например, переключающих доменов на основе FRB. В одном воплощении первый член может включать первый и второй переключающий домен, например, переключающий домен на основе FKBP и переключающий домен на основе FRB, и

40 второй член может включать первый и второй переключающий домен, например, переключающий домен на основе FKBP и переключающий домен на основе FRB.

В одном воплощении внутриклеточный сигнальный член включает один или больше внутриклеточных сигнальных доменов, например, первичный внутриклеточный

45 сигнальный домен и один или больше костимулирующих сигнальных доменов.

В одном воплощении антигенсвязывающий член может включать один или больше внутриклеточных сигнальных доменов, например, один или больше костимулирующих

сигнальных доменов. В одном воплощении антигенсвязывающий член включает несколько, например, 2 или 3 костимулирующих сигнальных домена, описанных в

настоящем описании, например, выбранных из 4-1BB, CD28, CD27, ICOS и OX40, и в воплощениях, без первичного внутриклеточного сигнального домена. В одном воплощении антигенсвязывающий член включает следующие костимулирующие сигнальные домены из внеклеточной или внутриклеточной области: 4-1BB-CD27; 4-1BB-CD27; CD27-4-1BB; 4-1BB-CD28; CD28-4-1BB; OX40-CD28; CD28-OX40; CD28-4-1BB или 4-1BB-CD28. В одном таком воплощении RCAR включает (1) антигенсвязывающий член, включающий антигенсвязывающий домен и первый переключающий домен; и (2) внутриклеточный сигнальный домен, включающий трансмембранный домен или мембрансвязанный домен и по меньшей мере один первичный сигнальный домен, и второй переключающий домен.

Одно воплощение относится к RCAR, в котором антигенсвязывающий член не связан с поверхностью CAR-клетки. Это позволяет клетке, имеющей внутриклеточный сигнальный член, удобно образовывать пару с одним или несколькими антигенсвязывающими доменами без трансформации клетки последовательностью, которая кодирует антигенсвязывающий член. В таких воплощениях RCAR включает 1) внутриклеточный сигнальный член, включающий первый переключающий домен, трансмембранный домен, внутриклеточный сигнальный домен, например, первичный внутриклеточный сигнальный домен, и первый переключающий домен; и 2) антигенсвязывающий член, включающий антигенсвязывающий домен и второй переключающий домен, причем антигенсвязывающий член не включает трансмембранный домен или мембрансвязанный домен, и, необязательно, не включает внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых воплощениях RCAR дополнительно может включать 3) второй антигенсвязывающий член, который связывает антиген иной, чем антиген, который связывается антигенсвязывающим доменом; и второй переключающий домен.

Также раскрываются RCAR, в которых антигенсвязывающий член включает способность к биспецифической активации и таргетингу. В таком воплощении антигенсвязывающий член может включать несколько, например, 2, 3, 4 или 5 антигенсвязывающих доменов, например, scFv, где каждый антигенсвязывающий домен связывается с антигеном-мишенью, например, различными антигенами или одним и тем же антигеном, например, одними и теми же или различными эпитопами на одном и том же антигене. В одном воплощении несколько антигенсвязывающих доменов находятся в тандеме, и необязательно, линкерный или шарнирный участок располагается между всеми антигенсвязывающими доменами. Подходящие линкерные и шарнирные участки описаны в настоящем описании.

Одно воплощение относится к RCAR, имеющим конфигурацию, которая допускает переключение пролиферации. В таком воплощении RCAR включает 1) внутриклеточный сигнальный член, включающий, необязательно, трансмембранный домен или мембрансвязанный домен; один или больше костимулирующих сигнальных доменов, например, выбранных из 4-1BB, CD28, CD27, ICOS и OX40, и переключающий домен; и 2) антигенсвязывающий член, включающий антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и первичный внутриклеточный сигнальный домен, например, домен CD3-дзета, причем антигенсвязывающий член не включает переключающий домен или не включает переключающий домен, который димеризуется с переключающим доменом на внутриклеточном сигнальном домене. В одном воплощении антигенсвязывающий член не включает костимулирующий сигнальный домен. В одном воплощении внутриклеточный сигнальный домен включает переключающий домен из гомодимеризующего переключателя. В одном воплощении внутриклеточный сигнальный

домен включает первый переключающий домен гетеродимеризующего переключателя, и RCAR включает второй внутриклеточный сигнальный член, который включает второй переключающий домен гетеродимеризующего переключателя. В таких воплощениях второй внутриклеточный сигнальный член включает те же внутриклеточные сигнальные домены, что и внутриклеточный сигнальный член. В одном воплощении димеризующий переключатель является внутриклеточным. В одном воплощении димеризующий переключатель является внеклеточным.

В любой из конфигураций RCAR, описанных в настоящем описании, первый и второй переключающие домены включают переключатель на основе FKBP-FRB, как описано в настоящем описании.

Изобретение также относится к клеткам, включающим RCAR, описанный в настоящем описании. Любая клетка, которая сконструирована для экспрессии RCAR, может быть использована как RCARX-клетка. В одном воплощении RCARX-клетка представляет собой Т-клетку и называется RCART-клеткой. В одном воплощении RCARX-клетка представляет собой НК-клетку и называется RCARN-клеткой.

Изобретение также относится к нуклеиновым кислотам и векторам, включающим RCAR-кодирующие последовательности. Последовательность, кодирующая различные элементы RCAR, может располагаться на одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты, например, одной и той же плазмиде или векторе, например, вирусном векторе, например, лентивирусном векторе. В одном воплощении (i) последовательность, кодирующая антигенсвязывающий член, и (ii) последовательность, кодирующая внутриклеточный сигнальный домен, могут присутствовать в одной и той же нуклеиновой кислоте, например, векторе. Продуцирования соответствующих белков можно достигнуть, например, путем использования отдельных промоторов или путем использования бицистронного продукта транскрипции (который может привести к продуцированию двух белков путем расщепления одного продукта трансляции или путем трансляции двух отдельных белковых продуктов). В одном воплощении последовательность, кодирующая способный расщепляться пептид, например, последовательность P2A или F2A, располагается между (i) и (ii). В одном воплощении последовательность, кодирующая IRES, например, EMCV или EV71 IRES, располагается между (i) и (ii). В таких воплощениях (i) и (ii) транскрибируются как одна РНК. В одном воплощении первый промотор операбельно связан с (i), и второй промотор операбельно связан с (ii), так что (i) и (ii) транслируются как отдельные мРНК.

С другой стороны, последовательность, кодирующая различные элементы RCAR, может располагаться на различных молекулах нуклеиновой кислоты, например, различных плаزمиде или векторах, например, вирусном векторе, например, лентивирусном векторе. Например, (i) последовательность, кодирующая антигенсвязывающий член, может присутствовать в первой нуклеиновой кислоте, и (ii) последовательность, кодирующая внутриклеточный сигнальный домен, может присутствовать во второй нуклеиновой кислоте, например, втором векторе.

Димеризирующие переключатели

Димеризирующие переключатели могут быть нековалентными или ковалентными. В нековалентном димеризирующем переключателе димеризирующая молекула промотирует нековалентное взаимодействие между переключающими доменами. В ковалентном димеризирующем переключателе димеризирующая молекула промотирует ковалентное взаимодействие между переключающими доменами.

В одном воплощении RCAR включает димеризирующий переключатель на основе FKBP/FRAP или FKBP/FRB. FKBP12 (связывающий белок FKBP или FK506) представляет

собой распространенный цитоплазматический белок, который служит в качестве исходной внутриклеточной мишени для природного продукта иммуносупрессорного лекарственного средства рапамицина. Рапамицин связывается с FKBP и с крупным PI3K, гомологичным FKBP (RAFT, mTOR). FKBP представляет собой часть FKBP в 93

5 аминокислоты, которая является достаточной для связывания комплекса FKBP-рапамицин (Chen J., Zheng X.F., Brown E.J. & Schreiber S.L. (1995), *Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein* и *characterization of a critical serine residue*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 92: 4947-51).

В воплощениях в переключателе на основе FKBP/FRAP, например, FKBP/FRB, можно

10 использовать димеризующую молекулу, например, рапамицин или аналог рапамицина.

Аминокислотная последовательность FKBP следующая:

D V P D Y A S L G G P S S P K K K R K V S R G V Q V E T I S P G D G R T F P K R G
Q T C V V H Y T G M L E D G K K F D S S R D R N K P F K F M L G K Q E V I R G W E E
G V A Q M S V G Q R A K L T I S P D Y A Y G A T G H P G I I P P H A T L V F D V E L L
15 K L E T S Y (SEQ ID NO: 205).

В воплощениях FKBP-переключающий домен может включать фрагмент FKBP, имеющий способность связываться с FRB или его фрагментом или аналогом в присутствии рапамицина или рапалога, например, подчеркнутой частью SEQ ID NO: 205, которая представляет собой

20 V Q V E T I S P G D G R T F P K R G Q T C V V H Y T G M L E D G K K F D S S R D R
N K P F K F M L G K Q E V I R G W E E G V A Q M S V G Q R A K L T I S P D Y A Y G A
T G H P G I I P P H A T L V F D V E L L K L E T S (SEQ ID NO: 206).

Аминокислотная последовательность FRB следующая:

I L W H E M W H E G L E E A S R L Y F G E R N V K G M F E V L E P L H A M M E R G P Q T L K E T S F
25 N Q A Y G R D L M E A Q E W C R K Y M K S G N V K D L T Q A W D L Y Y H V F R R I S K (SEQ ID NO: 207).

«Переключатель на основе FKBP/FRAP, например, FKBP/FRB» как термин, используемый в настоящем описании, относится к димеризующему переключателю, включающему первый переключающий домен, который включает фрагмент FKBP или его аналог, имеющий способность связываться с FRB или его фрагментом или аналогом

30 в присутствии рапамицина или рапалога, например, RAD001, и имеет по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичность или отличается не более, чем на 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотный остаток от последовательности FKBP SEQ ID NO: 54 или 55; и второй переключающий домен, который включает фрагмент FRB или его аналог, имеющий способность связываться с FRB или его фрагментом или

35 аналогом в присутствии рапамицина или рапалога, и имеет по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичность или отличается не более, чем на 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотный остаток от последовательности FRB SEQ ID NO: 56. В одном воплощении RCAR, описанный в настоящем описании, включает один переключающий домен, который включает аминокислотные остатки, раскрытые в SEQ

40 ID NO: 205 (или SEQ ID NO: 206), и один переключающий домен, который включает аминокислотные остатки, раскрытые в SEQ ID NO: 207.

В воплощениях FKBP/FRAP димеризующий переключатель включает модифицированный FRB-переключающий домен, который показывает измененное, например, усиленное, комплексообразование между переключающим доменом на

45 основе FRB, например, модифицированным FRB-переключающим доменом, переключающим доменом на основе FKBP, и димеризующей молекулой, например, рапамицином или рапалогом, например, RAD001. В одном воплощении модифицированный FRB-переключающий домен включает одну или больше мутаций,

например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше, выбранных из мутаций в аминокислотной (ых) позиции(ях) L2031, E2032, S2035, R2036, F2039, G2040, T2098, W2101, D2102, Y2105 и F2108, где аминокислота дикого типа мутирована на любую другую встречающуюся в природе аминокислоту. В одном воплощении мутант FRB включает E2032, где E2032 мутирована на фенилаланин (E2032F), метионин (E2032M), аргинин (E2032R), валин (E2032V), тирозин (E2032Y), изолейцин (E2032I), например, SEQ ID NO: 208, или лейцин (E2032L), например, SEQ ID NO: 209. В одном воплощении мутант FRB включает мутацию в T2098, где T2098 мутирована на фенилаланин (T2098F) или лейцин (T2098L), например, SEQ ID NO: 210. В одном воплощении мутант FRB включает мутацию в E2032 и в T2098, где E2032 мутирована на любую аминокислоту, и где T2098 мутирована на любую аминокислоту, например, SEQ ID NO: 211. В одном воплощении мутант FRB включает мутацию E2032I и T2098L, например, SEQ ID NO: 212. В одном воплощении мутант FRB включает мутацию E2032L и T2098L, например, SEQ ID NO: 213.

Таблица 9. Примеры мутантного FRB, имеющего повышенную аффинность к димеризующей молекуле

Мутант FRB	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
Мутант E2032I	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDL MEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRISKTS	208
Мутант E2032L	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDL MEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRISKTS	209
Мутант T2098L	ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDL MEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKTS	210
Мутант E2032, T2098	ILWHEMWHEGLXEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDL MEAQEWCRKYMKSGNVKDLXQAWDLYYHVFRRISKTS	211
Мутант E2032I, T2098L	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDL MEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKTS	212
Мутант E2032L, T2098L	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDL MEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKTS	213

Другие подходящие димеризующие переключатели включают димеризующий переключатель на основе GyrB-GyrB, димеризующий переключатель на основе гиббереллина, димеризующий переключатель tag/связка и димеризующий переключатель галоген-tag/snap-tag. После указаний, приведенных в настоящем описании, такие переключатели и релевантные димеризующие молекулы будут очевидны для специалиста в данной области техники.

Димеризующая молекула

Ассоциация между двумя переключающими доменами промотируется димеризующей молекулой. В присутствии димеризующей молекулы взаимодействие или ассоциация между переключающими доменами допускает сигнальную трансдукцию между полипептидом, ассоциированным, например, слитым, с первым переключающим доменом, и полипептидом, ассоциированным, например, слитым, со вторым переключающим доменом. В присутствии димеризующей молекулы сигнальная трансдукция усиливается в 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 5, 10, 50, 100 раз, например, при измерении в системе, описанной в настоящем описании.

В качестве димеризующих молекул в димеризующем переключателе на основе FKBP/FRB, описанном в настоящем описании, можно использовать рапамицин и аналоги рапамицина (иногда называемые рапалогами), например, RAD001. В одном воплощении димеризующую молекулу можно выбрать из рапамицина (сиролимуса), RAD001 (эверолимуса), зотаролимуса, темсиролимуса, AP-23573 (ридафоролимуса), биолимуса и AP21967. Другие аналоги рапамицина, подходящие для применения с димеризующими переключателями на основе FKBP/FRB, описаны также в разделе, озаглавленном

«Комбинированные терапии», или в разделе, озаглавленном «Комбинация с малой дозой ингибитора mTOR».

Расщепленный CAR

В некоторых воплощениях CAR-экспрессирующая клетка использует расщепленный CAR. Подход с расщепленным CAR описан подробнее в публикациях WO2014/055442 и WO2014/055657, включенных в настоящее описание в качестве ссылок. Коротко, система расщепленного CAR включает клетку, экспрессирующую первый CAR, имеющий первый антигенсвязывающий домен и костимулирующий домен (например, 41BB), и клетка также экспрессирует второй CAR, имеющий второй антигенсвязывающий домен и внутриклеточный сигнальный домен (например, CD3-дзета). Когда клетка сталкивается с первым антигеном, костимулирующий домен активируется, и клетка пролиферирует. Когда клетка сталкивается со вторым антигеном, активируется внутриклеточный сигнальный домен, и появляется активность убийства клеток. Таким образом, CAR-экспрессирующая клетка полностью активирована только в присутствии обоих антигенов. В воплощениях первый антигенсвязывающий домен узнает CLL-1, например, включает антигенсвязывающий домен, описанный в настоящем описании, и второй антигенсвязывающий домен узнает антиген, экспрессированный на клетках острого миелоидного лейкоза, например, CD123, CD33, CD34, FLT3 или фолатный рецептор бета. В воплощениях первый антигенсвязывающий домен узнает CLL-1, например, включает антигенсвязывающий домен, описанный в настоящем описании, и второй антигенсвязывающий домен узнает антиген, экспрессированный на В-клетках, например, CD19, CD20, CD22 или ROR1.

Устойчивость и мутации

Устойчивость CLL-1-связывающего домена, например, молекул scFv (например, растворимого scFv), можно оценить, обратившись к биофизическим свойствам (например, теплоустойчивости) общепринятой контрольной молекулы scFv или полноразмерного антитела. В одном воплощении человеческий scFv имеет теплоустойчивость, которая выше на примерно 0,1, примерно 0,25, примерно 0,5, примерно 0,75, примерно 1, примерно 1,25, примерно 1,5, примерно 1,75, примерно 2, примерно 2,5, примерно 3, примерно 3,5, примерно 4, примерно 4,5, примерно 5, примерно 5,5, примерно 6, примерно 6,5, примерно 7, примерно 7,5, примерно 8, примерно 8,5, примерно 9, примерно 9,5, примерно 10 градусов, примерно 11 градусов, примерно 12 градусов, примерно 13 градусов, примерно 14 градусов или примерно 15 градусов по Цельсию, чем у контрольной связывающей молекулы (например, общепринятой контрольной молекулы scFv) в описанных анализах.

Улучшенная теплоустойчивость анти-CLL-1 связывающего домена, например, scFv, по существу присуща всей конструкции CLL-1-CAR, что ведет к улучшенным терапевтическим свойствам конструкции CLL-1-CAR. Теплоустойчивость анти-CLL-1 связывающего домена, например, scFv, может быть улучшена по меньшей мере на примерно 2°C или 3°C по сравнению с обычным антителом. В другом воплощении анти-CLL-1 связывающий домен, например, scFv, имеет улучшенную на 2°C теплоустойчивость по сравнению с обычным антителом. В другом воплощении scFv имеет теплоустойчивость, улучшенную на 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15°C по сравнению с обычным антителом. Сравнение можно осуществить, например, между молекулами scFv, описанными в настоящем описании, и полноразмерными антителами. Теплоустойчивость можно измерить с использованием способов, известных в технике. Например, в одном воплощении можно измерить T_m. Способы измерения T_m и другие способы определения устойчивости белков, описаны подробнее ниже.

Мутации в scFv изменяют устойчивость scFv и улучшают общую устойчивость scFv и конструкции CART-CLL-1. Устойчивость человеческого scFv определяют с использованием измерений, таких как Tm, температуры денатурации и температуры агрегации.

5 Связывающую способность мутантных scFv можно определить с использованием анализов, описанных в примерах.

В одном воплощении анти-CLL-1 связывающий домен, например, scFv, включает по меньшей мере одну такую мутацию, что мутированный scFv приобретает улучшенную устойчивость для конструкции CART-CLL-1. В другом воплощении анти-CLL-1
10 связывающий домен, например, scFv, включает по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 мутаций, появляющихся в процессе гуманизации, так что мутированный scFv приобретает улучшенную устойчивость для конструкции CART-CLL-1.

Способы оценки устойчивости белков

Устойчивость антигенсвязывающего домена можно оценить с использованием,
15 например, способов, описанных ниже. Такие способы допускают определение нескольких переходов теплового разворачивания, где наименее устойчивый домен или разворачивается первым или ограничивает порог общей устойчивости многодоменной единицы, которая разворачивается кооперативно (например, мультидоменный белок, который показывает один переход разворачивания). Наименее устойчивый домен можно
20 идентифицировать рядом дополнительных путей. Можно выполнить мутагенез для зондирования домена, который ограничивает общую устойчивость. Дополнительно можно определить протеазорезистентность мультидоменного белка в условиях, в которых, наименее устойчивый белок действительно разворачивается, как известно из ДСК или других спектроскопических методов (Fontana *et al.*, (1997), Fold. Des., 2: R17-
25 26; Dimasi *et al.* (2009), J. Mol. Biol., 393: 672-692). Как только наименее устойчивый белок идентифицирован, последовательность, кодирующую этот домен (или его часть), можно использовать как тестовую последовательность в других способах.

а) Термоустойчивость

Термоустойчивость композиций можно анализировать с использованием ряда не
30 являющихся ограничительными биофизических или биохимических методов, известных в технике. В некоторых воплощениях термоустойчивость оценивают методами аналитической спектроскопии.

Примером методов аналитической спектроскопии является дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК). В ДСК используют калориметр, который
35 чувствителен к поглощению тепла, которое сопровождает разворачивание большинства белков или белковых доменов (см., например, Sanchez-Ruiz *et al.*, Biochemistry, 27: 1648-52, 1988). Для того, чтобы определить термоустойчивость белка, образец белка вставляют в калориметр, и поднимают температуру до тех пор, пока Fab или scFv не развернется. Температура, при которой белок разворачивается, является показателем
40 общей устойчивости белка.

Другим примером методов аналитической спектроскопии является спектроскопия кругового дихроизма (КД). КД спектрометрией измеряют оптическую активность композиции как функцию возрастающей температуры. Спектроскопией кругового дихроизма (КД) измеряют различия в абсорбции левоциркулярно поляризованного света против правоциркулярно поляризованного света, которая появляется из-за
45 структурной асимметрии. Разупорядоченная или развернутая структура приводит к КД-спектру, сильно отличающемуся от спектра упорядоченной или складчатой структуры. КД-спектр отражает чувствительность белков к денатурирующим действиям

повышающейся температуры и поэтому является показателем термоустойчивости белков (см. van Mierlo и Steemsma, J. Biotechnol., 79(3): 281-98, 2000).

Другим примером методов аналитической спектроскопии для измерения термоустойчивости является флуоресцентная эмиссионная спектроскопия (см. van Mierlo и Steemsma, цит. выше). Еще одним примером методов аналитической спектроскопии для измерения термоустойчивости является спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (см., например, van Mierlo и Steemsma, цит. выше).

Термоустойчивость композиции можно измерить биохимически. Примером биохимического метода оценки термоустойчивости является анализ с тепловой стимуляцией. В «анализе с тепловой стимуляцией» композицию подвергают воздействию интервала повышенных температур в течение установленного периода времени. Например, в одном воплощении испытываемые молекулы scFv или молекулы, включающие молекулы scFv, подвергают воздействию повышающихся температур, например, в течение 1-1,5 часов. Затем оценивают активность белка соответствующим биохимическим анализом. Например, если белок является связывающим белком (например, scFv или scFv-содержащим полипептидом), связывающую активность связывающего белка можно определить функциональным или количественным ELISA.

Такой анализ можно выполнить в высокопроизводительном формате и форматах, раскрытых в примерах, с использованием *E. coli* и высокопроизводительного скрининга. Можно создать библиотеку анти-CLL-1 связывающего домена, например, вариантов scFv, с использованием методов, известных в технике. Можно индуцировать экспрессию анти-CLL-1 связывающего домена, например, scFv, и анти-CLL-1 связывающий домен, например, scFv, можно подвергнуть тепловой стимуляции. Стимулированные испытываемые образцы можно анализировать на связывание, и те анти-CLL-1 связывающие домены, например, scFv, которые являются устойчивыми, можно размножить и охарактеризовать дополнительно.

Термоустойчивость оценивают путем измерения температуры плавления (T_m) композиции с использованием любого из вышеуказанных способов (например, методов аналитической спектроскопии). Температура плавления представляет собой температуру в средней точке кривой температурного перехода, где 50% молекул композиции находятся в свернутом состоянии (см. Dimasai et al. (2009), J. Mol. Biol., 393: 672-692). В одном воплощении величины T_m анти-CLL-1 связывающего домена, например, scFv, составляют примерно 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C, 46°C, 47°C, 48°C, 49°C, 50°C, 51°C, 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C, 66°C, 67°C, 68°C, 69°C, 70°C, 71°C, 72°C, 73°C, 74°C, 75°C, 76°C, 77°C, 78°C, 79°C, 80°C, 81°C, 82°C, 83°C, 84°C, 85°C, 86°C, 87°C, 88°C, 89°C, 90°C, 91°C, 92°C, 93°C, 94°C, 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, 99°C, 100°C. В одном воплощении величины T_m для IgG составляют примерно 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C, 46°C, 47°C, 48°C, 49°C, 50°C, 51°C, 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C, 66°C, 67°C, 68°C, 69°C, 70°C, 71°C, 72°C, 73°C, 74°C, 75°C, 76°C, 77°C, 78°C, 79°C, 80°C, 81°C, 82°C, 83°C, 84°C, 85°C, 86°C, 87°C, 88°C, 89°C, 90°C, 91°C, 92°C, 93°C, 94°C, 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, 99°C, 100°C.

Термоустойчивость также оценивают путем измерения удельной теплоемкости или теплоемкости (C_p) композиции с использованием аналитического калориметрического метода (например, ДСК). Удельная теплоемкость композиции представляет собой энергию (например, в ккал/моль), которая требуется для повышения температуры на 1°C 1 моля воды. Большая C_p является признаком денатурированной или инактивированной белковой композиции. Изменение теплоемкости (ΔC_p) композиции

измеряют путем определения удельной теплоемкости композиции до и после ее теплового перехода. Термоустойчивость также можно оценить путем измерения или определения других параметров термодинамической устойчивости, включая свободную энергию Гиббса разворачивания (ΔG), энтальпию разворачивания (ΔH) или энтропию

разворачивания (ΔS). Один или несколько из вышеуказанных биохимических анализов (например, анализ с тепловой стимуляцией) используют для определения температуры (т.е., величины T_c), при которой 50% композиции сохраняет свою активность (например, связывающую активность).

Кроме того, мутации в анти-CLL-1 связывающем домене, например, scFv, изменяют теплоустойчивость анти-CLL-1 связывающего домена, например, scFv, по сравнению с немутированным анти-CLL-1 связывающим доменом, например, scFv. В одном воплощении анти-CLL-1 связывающий домен, например, scFv, включает одну мутацию, которая придает теплоустойчивость анти-CLL-1 связывающему домену, например, scFv. В другом воплощении анти-CLL-1 связывающий домен, например, scFv, включает несколько мутаций, которые придают теплоустойчивость анти-CLL-1 связывающему домену, например, scFv. В одном воплощении несколько мутаций в анти-CLL-1 связывающем домене, например, scFv, оказывают аддитивное действие на теплоустойчивость анти-CLL-1 связывающего домена, например, scFv.

b) Агрегация, %

Устойчивость композиции можно определить путем измерения ее склонности к агрегации. Агрегацию можно измерить рядом не являющихся ограничительными биохимических или биофизических методов. Например, агрегацию композиции можно оценить с использованием хроматографии, например, гель-проникающей хроматографии (ГПХ). ГПХ разделяет молекулы на основании их размера. Колонку заполняют полутвердыми гранулами полимерного геля, который будет вмещать в себе ионы и небольшие молекулы, но не крупные молекулы. Когда белковую композицию вносят в верхнюю часть колонки, компактно свернутые белки (т.е., неагрегированные белки) распределяются в большем объеме растворителя, чем объем, доступный для крупных агрегатов белков. В результате крупные агрегаты быстрее продвигаются по колонке, и таким образом смесь может быть разделена или фракционирована на ее компоненты. Каждую фракцию можно отдельно определить количественно (например, с помощью светорассеяния), когда она элюируется из геля. Соответственно, % агрегации композиции можно определить путем сравнения фракции с общей концентрацией белка, внесенного в гель. Устойчивая композиция элюируется из колонки по существу как одна фракция, и появляется по существу один пик на профиле элюции или хроматограмме.

с) Аффинность связывания

Устойчивость композиции можно оценить путем определения ее аффинности связывания с мишенью. В технике известен широкий ряд способов определения аффинности связывания. В примере способа определения аффинности связывания используется поверхностный плазмонный резонанс. Поверхностный плазмонный резонанс представляет собой оптическое явление, которое допускает анализ биоспецифических взаимодействий в реальном времени путем детекции изменений в концентрациях белка в биосенсорной матрице, например, с использованием системы BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden и Piscataway, N.J.). Дополнительное описание см. в Jonsson U. et al. (1993), Ann. Biol. Clin., 51: 19-26; Jonsson U. (1991), Biotechniques, 11: 620-627; Johnsson B. et al. (1995), J. Mol. Recognit., 8: 125-131; и Johnsson B. et al. (1991), Anal. Biochem., 198: 268-277.

В одном аспекте антигенсвязывающий домен CAR включает аминокислотную

последовательность, которая гомологична аминокислотной последовательности антигенсвязывающего домена, описанного в настоящем описании, и антигенсвязывающий домен сохраняет нужные функциональные свойства фрагментов анти-CLL-1 антитела, описанного в настоящем описании. В одном конкретном аспекте композиции CAR по изобретению включает фрагмент антитела. В другом аспекте такой фрагмент антитела включает scFv.

В различных аспектах антигенсвязывающий домен CAR конструируют путем модификации одной или нескольких аминокислот в одном или обоих вариабельных участках (например, VH и/или VL), например, в одном или нескольких CDR участках и/или одном или нескольких каркасных участках. В одном конкретном аспекте композиции CAR по изобретению включает фрагмент антитела. В другом аспекте такой фрагмент антитела включает scFv.

Специалистам в данной области техники следует иметь в виду, что антитело или фрагмент антитела по изобретению можно дополнительно модифицировать таким образом, что изменяется аминокислотная последовательность (например, от дикого типа), но не нужная активность. Например, в белке можно сделать дополнительные замены нуклеотидов, ведущие к аминокислотным заменам «заменимых» аминокислотных остатков. Например, заменимый аминокислотный остаток в молекуле может быть заменен другим аминокислотным остатком из того же семейства боковых цепей. В другом воплощении ряд аминокислот может быть заменен структурно схожим рядом, который отличается порядком и/или составом членов семейства боковых цепей, например, можно осуществить консервативную замену, при которой аминокислотный остаток замещают аминокислотным остатком, имеющим схожую боковую цепь.

Семейства аминокислотных остатков, имеющих схожие боковые цепи, определены в технике как включающие основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотные боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

Процент идентичности в контексте двух или больше нуклеотидных или аминокислотных последовательностей относится к двум или больше одинаковым последовательностям. Две последовательности являются «по существу идентичными», если две последовательности имеют определенный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (например, 60% идентичность, необязательно, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичность в определенном участке или, когда не конкретизировано, во всей последовательности), когда сравнивают и выравнивают для максимального соответствия в окне сравнения, или обозначенном участке при измерении с использованием одного или нескольких следующих далее алгоритмов сравнения последовательностей или выравнивания вручную и визуальной проверки. Необязательно идентичность существует в участке, который имеет по меньшей мере примерно 50 нуклеотидов (или 10 аминокислот) в длину, или предпочтительнее участке, который имеет по меньшей мере 100-500 или 1000 или больше нуклеотидов (или 20, 50, 200 или больше аминокислот) в длину.

Для сравнения последовательностей обычно одна последовательность действует

как эталонная последовательность, с которой сравнивают испытываемые последовательности. Когда используют алгоритм сравнения последовательностей, испытываемую и эталонную последовательности вводят в компьютер, при необходимости обозначают координаты последовательностей и создают параметры программы алгоритма последовательностей. Можно использовать параметры программы по умолчанию, или можно разработать альтернативные параметры. Затем алгоритм сравнения последовательностей вычисляет процент идентичности последовательностей для испытываемой последовательности относительно эталонной последовательности на основании параметров программы. Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в технике. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно провести, например, с помощью алгоритма локальной гомологии по Smith и Waterman (1970), *Adv. Appl. Math.*, 2:482с, с помощью алгоритма гомологического выравнивания по Needleman и Wunsch (1970), *J. Mol. Biol.*, 48: 443, поиском методом подобия по Pearson и Lipman (1988), *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 85: 2444, с помощью компьютеризированных разработок таких алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программ Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), или выравнивания вручную и визуальной проверки (см., например, Brent et al. (2003), *Current Protocols in Molecular Biology*).

Двумя примерами алгоритмов, которые подходят для определения процента идентичности последовательностей и подобия последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul et al. (1977), *Nuc. Acids Res.*, 25: 3389-3402; и Altschul et al. (1990), *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410, соответственно.

Процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями также можно определить с использованием алгоритма в E. Meyers и W. Miller (1988), *Comput. Appl. Biosci.*, 4: 11-17, который включен в программу ALIGN (версия 2.0), с использованием весовой таблицы остатков PAM120, штрафа за удлинение гэпа 12 и штрафа за гэп 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно определить с использованием алгоритма по Needleman и Wunsch (1970), *J. Mol. Biol.*, 48: 444-453, который включен в программу GAP в пакете программ GCG (доступен на www.gcg.com), с использованием или матрицы Blossom 62 или матрицы PAM250 и гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и удлинения гэпа 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к модификациям аминокислотной последовательности исходного антитела или фрагмента (например, scFv), которые генерируют функционально эквивалентные молекулы. Например, VH или VL анти-CLL-1 связывающего домена, например, scFv, включенного в CAR, можно модифицировать для сохранения по меньшей мере примерно 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности исходных VH или VL каркасного участка анти-CLL-1 связывающего домена, например, scFv. Настоящее изобретение относится к модификациям всей конструкции CAR, например, модификациям в одной или нескольких аминокислотных последовательностях различных доменов конструкции CAR для того, чтобы генерировать функционально эквивалентные молекулы.

Конструкцию CAR можно модифицировать для сохранения по меньшей мере примерно 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности исходной конструкции CAR.

Трансфекция РНК

В настоящем изобретении раскрываются способы получения *in vitro* CAR с транскрибированной РНК. Настоящее изобретение также включает CAR, кодирующий конструкцию РНК, которую можно непосредственно трансфицировать в клетку. Способ генерации мРНК для применения в трансфекции может включать *in vitro* транскрипцию (IVT) матрицы с помощью специально созданных праймеров с последующим добавлением полиА для получения конструкции, содержащей 3'- и 5'-нетранслируемую последовательность («UTR»), 5'-кэп и/или внутренний сайт входа рибосомы (IRES), нуклеиновую кислоту для экспрессии и хвост полиА, обычно длиной в 50-2000 оснований (SEQ ID NO: 35). Полученная таким образом РНК может эффективно трансфицировать различные виды клеток. В одном аспекте матрица включает последовательности для CAR.

В одном аспекте анти-CLL-1 CAR кодируется матричной РНК (мРНК). В одном аспекте мРНК, кодирующую анти-CLL-1 CAR, вводят в Т-клетку для получения клетки CART.

В одном воплощении *in vitro* CAR с транскрибированной РНК можно ввести в клетку как форму временной трансфекции. РНК получают транскрипцией *in vitro* с использованием матрицы, полученной полимеразной цепной реакцией (ПЦР). Представляющую интерес ДНК из любого источника можно непосредственно конвертировать ПЦР в матрицу для синтеза мРНК *in vitro* с использованием соответствующих праймеров и РНК-полимеразы. Источником ДНК может являться, например, геномная ДНК, плазмидная ДНК, фаговая ДНК, кДНК, синтетическая ДНК-последовательность или любой другой соответствующий источник ДНК. Желательной матрицей для транскрипции *in vitro* является CAR по настоящему изобретению. Например, матрица для РНК CAR включает внеклеточный участок, включающий одноцепочечный вариабельный домен противоопухолевого антитела, шарнирный участок, трансмембранный домен (например, трансмембранный домен CD8a) и цитоплазматический участок, который включает внутриклеточный сигнальный домен, например, включающий сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен 4-1BB.

В одном воплощении ДНК, используемая для ПЦР, содержит открытую рамку считывания. ДНК может быть из ДНК-последовательности, встречающейся в природе, из генома организма. В одном воплощении нуклеиновая кислота включает некоторые или все 5'- и/или 3'-нетранслируемые участки (UTR). Нуклеиновая кислота может включать экзоны и интроны. В одном воплощении ДНК, используемая для ПЦР, представляет собой человеческую нуклеотидную последовательность. В другом воплощении ДНК, используемая для ПЦР, представляет собой человеческую нуклеотидную последовательность, включающую 5'- и 3'-UTR. С другой стороны, ДНК может представлять собой искусственную ДНК-последовательность, которая по природе не экспрессируется во встречающемся в природе организме. Примером искусственной ДНК-последовательности является последовательность, которая содержит части генов, которые лигированы вместе с образованием открытой рамки считывания, которая кодирует слитый белок. Части ДНК, которые лигированы вместе, могут быть из одного организма или из более, чем одного организма.

ПЦР используют для генерации матрицы для транскрипции *in vitro* мРНК, которую используют для трансфекции. Способы выполнения ПЦР известны в технике. Праймеры для использования в ПЦР создают как имеющие участки, которые по существу комплементарны участкам ДНК, используемой в качестве матрицы для ПЦР. «По существу комплементарны», как используется в настоящем описании, относится к

последовательностям нуклеотидов, где большинство или все основания в праймерной последовательности являются комплементарными, или одно или несколько оснований являются некомплементарными или ошибочными. По существу комплементарные последовательности способны отжигаться или гибридизировать с предполагаемой ДНК-мишенью в условиях отжига, используемых для ПЦР. Праймеры могут быть созданы как являющиеся по существу комплементарными любой части ДНК-матрицы. Например, праймеры могут быть созданы для амплификации части нуклеиновой кислоты, которая естественно транскрибирована в клетках (открытая рамка считывания), включающая 5'- и 3'-UTR. Праймеры также можно создать для амплификации части нуклеиновой кислоты, которая кодирует определенный представляющий интерес домен. В одном воплощении праймеры создают для амплификации кодирующего участка кДНК, включая все или части 5'- и 3'-UTR. Праймеры, применимые для ПЦР, можно получить методами синтеза, которые хорошо известны в технике. «Прямые праймеры» являются праймерами, которые содержат участок нуклеотидов, которые по существу комплементарны нуклеотидам ДНК-матрицы, которые находятся в обратном направлении последовательности ДНК, которую амплифицируют. «В обратном направлении» используется в настоящем описании как относящееся к местоположению 5' для последовательности ДНК, которую амплифицируют, относительно кодирующей цепи. «Обратные праймеры» являются праймерами, которые содержат участок нуклеотидов, которые по существу комплементарны двухцепочечной ДНК-матрице, которые находятся в прямом направлении последовательности ДНК, которую амплифицируют. «В прямом направлении» используется в настоящем описании как относящееся к местоположению 3' для последовательности ДНК, которую амплифицируют, относительно кодирующей цепи.

Любую ДНК-полимеразу, применимую для ПЦР, можно использовать в способах, раскрытых в настоящем описании. Реагенты и полимеразы являются коммерчески доступными из ряда источников.

Также можно использовать химические структуры, способные промотировать устойчивость и/или эффективность трансляции. РНК предпочтительно имеет 5'- и 3'-UTR. В одном воплощении 5'-UTR составляет от одного до 3000 нуклеотидов в длину. Длину последовательностей 5'- и 3'-UTR, добавляемых к кодирующему участку, можно изменять различными способами, включая, но не ограничиваясь перечисленным, создание праймеров для ПЦР, которые отжигаются к различным участкам UTR. С использованием такого подхода специалист в данной области техники может модифицировать длину 5'- и 3'-UTR, требуемых для достижения оптимальной эффективности трансляции после трансфекции транскрибированной РНК.

5'- и 3'-UTR могут быть встречающимися в природе эндогенными 5'- и 3'-UTR для нуклеиновой кислоты, представляющей интерес. С другой стороны, последовательности UTR, которые не являются эндогенными для нуклеиновой кислоты, представляющей интерес, могут быть добавлены путем внедрения последовательностей UTR в прямые и обратные праймеры или путем других модификаций матрицы. Использование последовательностей UTR, которые не являются эндогенными для нуклеиновой кислоты, представляющей интерес, можно применить для модификации устойчивости и/или эффективности трансляции РНК. Например, известно, что богатые AU элементы в последовательностях 3'-UTR могут снизить устойчивость мРНК. Поэтому 3'-UTR можно выбрать или создать для повышения устойчивости транскрибированной РНК на основании свойств UTR, которые хорошо известны в технике.

В одном воплощении 5'-UTR может содержать последовательность Козак эндогенной нуклеиновой кислоты. С другой стороны, когда 5'-UTR, которая не является эндогенной для нуклеиновой кислоты, представляющей интерес, добавляют с помощью ПЦР, как описано выше, консенсусную последовательность Козак можно перепланировать путем добавления последовательности 5'-UTR. Последовательности Козак могут повышать эффективность трансляции некоторых транскриптов РНК, но не требуются для всех РНК для возможности эффективной трансляции. Требование последовательностей Козак для многих мРНК известно в технике. В других воплощениях 5'-UTR может представлять собой 5'-UTR РНК вируса, геном РНК которого устойчив в клетках. В других воплощениях в 3'- или 5'-UTR можно использовать различные нуклеотидные аналоги для препятствования разрушению мРНК эндонуклеазами.

Для возможности синтеза РНК из ДНК-матрицы без необходимости клонирования гена к ДНК-матрице необходимо присоединить промотор транскрипции в прямом направлении транскрибируемой последовательности. Когда последовательность, которая функционирует как промотор для РНК-полимераз, добавляют к 5'-концу прямого праймера, РНК-полимеразный промотор становится внедренным в продукт ПЦР в обратном направлении открытой рамки считывания, которую следует транскрибировать. В одном предпочтительном воплощении промотор представляет собой полимеразный промотор Т7, как описано в другом месте в настоящем описании. Другие применимые промоторы включают, но не ограничиваются перечисленным Т3 и SP6 РНК-полимеразные промоторы. Консенсусные нуклеотидные последовательности для промоторов Т7, Т3 и SP6, известны в технике.

В предпочтительном воплощении мРНК имеет как кэп на 5'-конце, так и хвост 3'-поли(А), которые определяют связывание рибосомы, инициацию трансляции и устойчивость мРНК в клетке. На кольцевой ДНК-матрице, например, плазмидной ДНК, РНК-полимераза продуцирует длинный конкатамерный продукт, который не подходит для экспрессии в эукариотных клетках. Транскрипция плазмидной ДНК, линеаризованной в конце 3'-UTR, приводит к мРНК нормального размера, которая неэффективна в эукариотной транскрипции, даже если она полиаденилирована после транскрипции.

На линейной ДНК-матрице фаговая Т7 РНК-полимераза может наращивать 3'-конец транскрипта позади последнего основания матрицы (Schenborn и Mierendorf, *Nuc. Acids Res.*, 13: 6223-36 (1985); Nacheva и Berzal-Herranz, *Eur. J. Biochem.*, 270: 1485-65 (2003).

Обычным способом интеграции отрезков полиА/Т в ДНК-матрицу является молекулярное клонирование. Однако последовательность полиА/Т, интегрированная в плазмидную ДНК, может вызвать неустойчивость плазмиды, в силу чего матрицы плазмидных ДНК, полученные из бактериальных клеток, часто являются весьма загрязненными делециями и другими отклонениями. Это делает процедуры клонирования не только трудоемкими и затратными по времени, но часто ненадежными. Вот почему весьма желателен способ, который допускает конструирование ДНК-матриц с отрезком полиА/Т без клонирования.

Сегмент полиА/Т транскрипционной ДНК-матрицы можно получить во время ПЦР путем использования обратного праймера, содержащего хвост полиТ, такой как хвост 100Т (SEQ ID NO: 31) (размер может составлять 50-5000 Т (SEQ ID NO: 32)), или после ПЦР любым другим способом, включая, но не ограничиваясь перечисленным, лигирование ДНК или рекомбинацию *in vitro*. Хвосты поли(А) также придают устойчивость РНК и снижают их разрушение. Как правило, длина хвоста поли(А) положительно коррелирует с устойчивостью транскрибированной РНК. В одном

воплощении хвост поли(А) составляет от 100 до 5000 аденозинов (SEQ ID NO: 33).

Хвосты поли(А) РНК можно дополнительно нарастить после транскрипции *in vitro* с использованием поли(А)-полимеразы, такой как полиА-полимераза *E. coli* (E-PAP). В одном воплощении увеличение длины хвоста поли(А) от 100 нуклеотидов до 300-400 нуклеотидов (SEQ ID NO: 34) приводит к примерно двукратному возрастанию эффективности трансляции РНК. Кроме того, присоединение различных химических групп к 3'-концу может увеличить устойчивость мРНК. Такое присоединение может содержать модифицированные/искусственные нуклеотиды, аптамеры и другие соединения. Например, в хвост поли(А) можно включить аналоги АТФ с использованием поли(А)-полимеразы. Аналоги АТФ могут дополнительно повышать устойчивость РНК.

Кэпы 5' также придают устойчивость молекулам РНК. В предпочтительном воплощении РНК, полученные способами, раскрытыми в настоящем описании, включают 5'-кэп. Кэп 5' обеспечивается с использованием методов, известных в технике, и описанных в настоящем описании (Cougot et al., *Trends in Biochem. Sci.*, 29: 436-444 (2001); Stepinski et al., *RNA*, 7: 1468-95 (2001); Elango et al., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 330: 958-966 (2005)).

РНК, полученные способами, раскрытыми в настоящем описании, также могут содержать внутренний сайт входа рибосомы (IRES). Последовательность IRES может быть вирусной, хромосомной или искусственно созданной последовательностью, которая инициирует кэп-независимое связывание рибосомы с мРНК и облегчает инициацию транскрипции. Могут быть включены любые растворимые вещества, подходящие для электропорации клеток, которые могут содержать факторы, облегчающие проницаемость и жизнеспособность клеток, такие как сахара, пептиды, липиды, белки, антиоксиданты и поверхностно-активные вещества.

РНК можно ввести в клетки-мишени с использованием любого из ряда различных способов, например, коммерчески доступных способов, которые включают, но не ограничиваются перечисленным, электропорацию (Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Cologne, Germany)), (ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.) или Gene Pulser II (BioRad, Denver, Colo.) мультипоратором (Eppendorf, Hamburg Germany), трансфекцию, опосредованную катионными липосомами, с использованием липофекции, инкапсуляцию в полимерах, пептидопосредованную трансфекцию или системы доставки с биолистическими частицами, такие как «генные пушки» (см., например, Nishikawa et al. *Hum. Gene Ther.*, 12(8): 861-70 (2001)).

Невирусные способы доставки

В некоторых аспектах можно использовать невирусные способы для доставки нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, описанный в настоящем описании, в клетку или ткань или субъекту.

В некоторых воплощениях невирусный способ включает использование транспозона (также называемого транспозонным элементом). В некоторых воплощениях транспозон представляет собой часть ДНК, которая может сама встраиваться в местоположение в геноме, например, часть ДНК, которая способна к саморепликации и встраиванию своей копии в геном, или часть ДНК, которую можно сплайсировать из более длинной нуклеиновой кислоты и встроить в другое место в геноме. Например, транспозон включает ДНК-последовательность, полученную из генов, фланкирующих инвертированные повторы для транспозиции.

Примеры способов доставки нуклеиновой кислоты с использованием транспозона, включают транспозонную систему Sleeping Beauty (SBTS) и транспозонную систему

piggyBac (PB). См., например, Aronovich et al., Hum. Mol. Genet. 20.R1(2011): R14-20; Singh et al., Cancer Res., 15 (2008): 2961-2971; Huang et al., Mol. Ther., 16 (2008): 580-589; Grabundzija et al., Mol. Ther., 18 (2010): 1200-1209; Kebriai et al., Blood, 122.21(2013): 166; Williams, Molecular Therapy, 16.9(2008): 1515-16; Bell et al., Nat. Protoc., 2.12(2007): 3153-65; и Ding et al., Cell, 122.3(2005): 473-83, которые все включены в настоящее описание в качестве ссылок.

SBTS включает два компонента: (1) транспозонсодержащий трансген и (2) источник фермента транспозазы. Транспозон может транспонировать транспозон из плазмиды-носителя (или другого донора ДНК) в ДНК-мишень, такую как хромосома/геном клетки-реципиента. Например, транспозаза связывается с плазмидой-носителем/донором ДНК, вырезает транспозон (включая трансген(ы)) из плазмиды и встраивает его в геном клетки-реципиента. См., например, Aronovich et al., цит. выше.

Примеры транспозонов включают транспозон на основе pT2. См., например, работы Grabundzija et al., Nucleic Acids Res., 41.3(2013): 1829-47; и Singh et al., Cancer Res., 68.8 (2008): 2961-2971, которые все включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Примеры транспозаз включают транспозазу типа Tc1/mariner, например, транспозазу SB10 или транспозазу SB11 (гиперактивная транспозаза, которая может быть экспрессирована, например, из цитомегаловирусного промотора). См., например, работы Aronovich et al.; Kebriai et al.; и Grabundzija et al., которые все включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Применение SBTS делает возможной эффективную интеграцию и экспрессию трансгена, например, нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, описанный в настоящем описании. Предлагаются способы получения клетки, например, Т-клетки или НК-клетки, которая устойчиво экспрессирует CAR, описанный в настоящем описании, например, с использованием транспозонной системы, такой как SBTS.

В соответствии со способами, описанными в настоящем описании, в некоторых воплощениях в клетку (например, Т- или НК-клетку) доставляют одну или больше нуклеиновых кислот, например, плазмид, содержащих компоненты SBTS. Например, нуклеиновую(ые) кислоту(ы) доставляют стандартными способами доставки нуклеиновой кислоты (например, плазмидной ДНК), например, способами, описанными в настоящем описании, например, электропорацией, трансфекцией или липофекцией. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота содержит транспозон, включающий трансген, например, нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, описанный в настоящем описании. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота содержит транспозон, включающий трансген (например, нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, описанный в настоящем описании), а также нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент транспозазу. В других воплощениях предлагается система с двумя нуклеиновыми кислотами, например, двухплазмидная система, например, в которой первая плазида содержит транспозон, включающий трансген, и вторая плазида содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент транспозазу. Например, первая и вторая нуклеиновые кислоты доставляются в клетку совместно.

В некоторых воплощениях получают клетки, например, Т- или НК-клетки, которые экспрессируют CAR, описанный в настоящем описании, путем использования комбинации встраивания гена с использованием SBTS и генетического редактирования с использованием нуклеазы (например, нуклеаз «цинковый палец» (ZFN), эффекторных нуклеаз, подобных активаторам транскрипции (TALEN), системы CRISPR/Cas или хоминг-эндонуклеаз, повторно сконструированных сконструированными мегануклеазами.

В некоторых воплощениях применение невирусного метода доставки делает возможным перепрограммирование клеток, например, Т- или НК-клеток, и прямую инфузию клеток субъекту. Преимущества невирусных векторов включают, но не ограничиваются перечисленным, простоту и относительно низкую стоимость получения достаточных количеств, необходимых для удовлетворения популяции пациентов, устойчивости при хранении и отсутствие иммуногенности.

Конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим одну или несколько конструкций CAR, описанных в настоящем описании. В одном аспекте молекула нуклеиновой кислоты предоставляется как транскрипт матричной РНК. В одном аспекте молекула нуклеиновой кислоты предоставляется как конструкция ДНК.

Соответственно, в одном аспекте изобретение относится к изолированной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR включает анти-CLL-1 связывающий домен (например, человеческий анти-CLL-1 связывающий домен), трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, включающий стимулирующий домен, например, костимулирующий сигнальный домен и/или первичный сигнальный домен, например, дзета-цепь. В одном воплощении анти-CLL-1 связывающий домен представляет собой анти-CLL-1 связывающий домен, описанный в настоящем описании, например, анти-CLL-1 связывающий домен, который включает последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 39-51, или последовательность с 95-99% идентичностью ей. В одном воплощении трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен белка, описанный в настоящем описании, например, выбранный из группы, включающей альфа-, бета- или дзета-цепь Т-клеточного рецептора, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и CD154. В одном воплощении трансмембранный домен включает SEQ ID NO: 6 или последовательность с 95-99% идентичностью ей. В одном воплощении анти-CLL-1 связывающий домен соединяется с трансмембранным доменом шарнирным участком, например, шарниром, описанным в настоящем описании. В одном воплощении шарнирный участок включает SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 или последовательность с 95-99% идентичностью им. В одном воплощении изолированная молекула нуклеиновой кислоты дополнительно включает последовательность, кодирующую костимулирующий домен. В одном воплощении костимулирующий домен представляет собой функциональный сигнальный домен белка, описанный в настоящем описании, например, выбранный из группы, включающей молекулу ГКГС класса I, белки рецептора TNF, иммуноглобулиноподобные белки, цитокиновые рецепторы, интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM), активирующие рецепторы НК-клеток, BTLA, лиганд Toll-рецептора, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (тактильный), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/

Сbp, CD19a и лиганд, который специфически связывается CD83.

В одном воплощении костимулирующий домен включает последовательность SEQ ID NO: 7 или последовательность с 95-99% идентичностью ей. В одном воплощении внутриклеточный сигнальный домен включает функциональный сигнальный домен 4-1BB и функциональный домен CD3-дзета. В одном воплощении внутриклеточный сигнальный домен включает последовательность SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8 или последовательность с 95-99% идентичностью им, и последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10 или последовательность с 95-99% идентичностью им, где последовательности, включающие внутриклеточный сигнальный домен, экспрессируются в одной и той же рамке считывания и в виде одной полипептидной цепи.

В другом аспекте изобретение относится к изолированной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей конструкцию CAR, включающую лидерную последовательность SEQ ID NO: 1, домен scFv, имеющий последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 39-51 (или последовательность с 95-99% идентичностью им), шарнирный участок SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 (или последовательность с 95-99% идентичностью им), трансмембранный домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 6 (или последовательность с 95-99% идентичностью ей), костимулирующий домен 4-1BB, имеющий последовательность SEQ ID NO: 7, или костимулирующий домен CD27, имеющий последовательность SEQ ID NO: 8 (или последовательность с 95-99% идентичностью ей), или костимулирующий домен CD28, имеющий последовательность SEQ ID NO: 482 (или последовательность с 95-99% идентичностью ей), или костимулирующий домен ICOS, имеющий последовательность SEQ ID NO: 483 (или последовательность с 95-99% идентичностью ей), и стимулирующий домен CD3-дзета, имеющий последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10 (или последовательность с 95-99% идентичностью им).

В другом аспекте изобретение относится к изолированной молекуле полипептида, кодированной молекулой нуклеиновой кислоты. В одном воплощении изолированная молекула полипептида включает последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 91-103, или последовательность с 95-99% идентичностью им.

В другом аспекте изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу химерного антигенного рецептора (CAR), которая включает анти-CLL-1 связывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, включающий стимулирующий домен, и где указанный анти-CLL-1 связывающий домен включает последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 39-51, или последовательность с 95-99% идентичностью им.

В одном воплощении кодированная молекула CAR дополнительно включает последовательность, кодирующую костимулирующий домен. В одном воплощении костимулирующий домен представляет собой функциональный сигнальный домен белка, выбранного из группы, включающей молекулу ГКГС класса I, белки рецептора TNF, иммуноглобулиноподобные белки, цитокиновые рецепторы, интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM), активирующие рецепторы NK-клеток, BTLA, лиганд Toll-рецептора, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4),

CD84, CD96 (тактильный), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a и лиганд, который специфически связывается CD83. В одном воплощении

5 костимулирующий домен 4-1BB включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. В одном воплощении костимулирующий домен CD27 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В одном воплощении костимулирующий домен CD28 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 482. В одном воплощении костимулирующий домен ICOS включает

10 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 484.

В одном воплощении трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен белка, выбранного из группы, включающей альфа-, бета- или дзета-цепь Т-клеточного рецептора, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, молекулу ГКГС класса I, белки рецептора

15 TNF, иммуноглобулиноподобные белки, цитокиновые рецепторы, интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM), активирующие рецепторы NK-клеток, BTLA, лиганд Toll-рецептора, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRP1), NKp44, NKp30, NKp46,

20 CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (тактильный), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1,

25 CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a и лиганд, который специфически связывается CD83. В одном воплощении трансмембранный домен включает последовательность SEQ ID NO: 6. В одном воплощении внутриклеточный сигнальный домен включает функциональный сигнальный

30 домен 4-1BB и функциональный сигнальный домен дзета. В одном воплощении внутриклеточный сигнальный домен включает последовательность SEQ ID NO: 9, где последовательности, включающие внутриклеточный сигнальный домен, экспрессируются в одной и той же рамке считывания и в виде одной полипептидной цепи. В одном воплощении анти-CLL-1 связывающий домен соединен с трансмембранным доменом

35 шарнирным участком. В одном воплощении шарнирный участок включает SEQ ID NO: 2. В одном воплощении шарнирный участок включает SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5.

В другом аспекте изобретение относится к кодированной молекуле CAR, включающей лидерную последовательность SEQ ID NO: 1, домен scFv, имеющий последовательность,

40 выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 39-51, или последовательность с 95-99% идентичностью им, шарнирный участок SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5, трансмембранный домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 6, костимулирующий домен 4-1BB, имеющий последовательность SEQ ID NO: 7, или костимулирующий домен CD27, имеющий последовательность SEQ ID NO:

45 8, и стимулирующий домен CD3-дзета, имеющий последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10. В одном воплощении кодированная молекула CAR включает последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 91-93, или последовательность с 95-99% идентичностью им.

Нуклеотидные последовательности, кодирующие нужные молекулы, можно получить с использованием способов, известных в технике, например, путем скрининга библиотек из клеток, экспрессирующих ген, путем дериватизации гена из вектора, известного как включающего их, или путем выделения прямо из клеток и тканей, содержащих их, с использованием стандартных методов. С другой стороны, ген, представляющий интерес, можно получить синтетически, а не клонированием.

Настоящее изобретение также относится к векторам, в которые встроена ДНК по настоящему изобретению. Векторы, полученные из ретровирусов, таких как лентивирус, являются подходящими инструментами для достижения долговременного переноса гена, устойчивой интеграции трансгена и его размножения в дочерних клетках.

Лентивирусные векторы имеют дополнительное преимущество перед векторами, полученными из онкоретровирусов, таких как вирусы лейкоза мыши, в том, что они могут трансдуцировать непрофилирующие клетки, такие как гепатоциты. Они также имеют дополнительное преимущество низкой иммуногенности. Ретровирусный вектор также может представлять собой, например, гамма-ретровирусный вектор. Гамма-ретровирусный вектор может включать, например, промотор, сигнал упаковки (ψ), сайт связывания праймера (PBS), один или больше (например, два) длинных концевых повторов (PBS) и трансген, представляющий интерес, например, ген, кодирующий CAR. Гамма-ретровирусный вектор может утратить вирусные структурные гены, такие как gag, pol и env. Примеры гамма-ретровирусных векторов включают вирус лейкоза мыши (MLV), вирус, формирующий фокус на селезенке (SFFV), и вирус миелопролиферативной саркомы (MPSV), и векторы, полученные из них. Другие гамма-ретровирусные векторы описаны, например, в Tobias Maetzig et al., «Gammaretroviral Vectors: Biology, Technology and Application», *Viruses*, 2011 Jun; 3(6): 677-713.

В другом воплощении вектор, включающий нуклеиновую кислоту, кодирующую нужный CAR, представляет собой аденовирусный вектор (A5/35). В другом воплощении экспрессию нуклеиновых кислот, кодирующих CAR, можно выполнить с использованием трнаспазонов, таких как sleeping beauty, crisper, CAS9 и нуклеазы «цинковые пальцы». См. ниже работу June et al., 2009, *Nature Reviews Immunology*, 9.10: 704-716, включенную в настоящее описание в качестве ссылки.

Как краткий итог, экспрессии природных или синтетических нуклеиновых кислот, кодирующих CAR, обычно достигают путем операбельного соединения нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид CAR или его части, с промотором и включения конструкции в экспрессирующий вектор. Векторы могут подходить для репликации и интеграции эукариот. Типичные клонирующие векторы содержат терминаторы транскрипции и трансляции, иницирующие последовательности и промоторы, применимые для регуляции экспрессии нужной нуклеотидной последовательности.

Экспрессирующие конструкции по настоящему изобретению также можно использовать для иммунизации нуклеиновой кислотой и генной терапии с использованием стандартных протоколов доставки генов. Способы доставки генов известны в технике. См., например, пат. США №№ 5399346, 5580859, 5589466, полностью включенные в настоящее описание в качестве ссылок. В другом воплощении изобретение относится к вектору для генной терапии.

Нуклеиновую кислоту можно клонировать в ряд типов векторов. Например, нуклеиновую кислоту можно клонировать в вектор, включая, но не ограничиваясь перечисленным, плазмиду, фагемид, производное фага, зоовирус и космиду. Векторы, представляющие определенный интерес, включают экспрессирующие векторы, векторы для репликации, векторы для получения зондов и векторы для секвенирования.

Кроме того, экспрессирующий вектор может быть предоставлен клетке в форме вирусного вектора. Технология вирусных векторов хорошо известна в технике и описана, например, в Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY, и других руководствах по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, которые применимы в качестве векторов, включают, но не ограничиваются перечисленным, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса и лентивирусы. Как правило, подходящий вектор содержит ориджин репликации, функциональный по меньшей мере в одном организме, промоторную последовательность, удобные сайты для рестрикционных эндонуклеаз и один или несколько селективируемых маркеров (см., например, WO 01/96584; WO 01/29058 и пат. США № 6326193).

Разработан ряд систем на основе вирусов для переноса генов в клетки млекопитающих. Например, удобную платформу для систем доставки генов обеспечивают ретровирусы. Выбранный ген можно встроить в вектор и упаковать в ретровирусные частицы с использованием методов, известных в технике. Затем рекомбинантный вирус можно выделить и доставить в клетки субъекта или *in vivo* или *ex vivo*. В технике известен ряд ретровирусных систем. В некоторых воплощениях используются аденовирусные векторы. В технике известен ряд аденовирусных векторов. В одном воплощении используются лентивирусные векторы.

Дополнительные промоторные элементы, например, энхансеры, регулируют частоту инициации транскрипции. Обычно они локализуются в участке 30-110 п.о. в обратном направлении от стартового сайта, хотя показано, что ряд промоторов также содержат функциональные элементы в прямом направлении от стартового сайта. Спейсинг между промоторными элементами часто является жестким, так что промоторная функция сохраняется, когда элементы инвертированы или сдвинуты относительно друг друга. В тимидинкиназном (tk) промоторе спейсинг между промоторными элементами может быть увеличен до 50 п.о. до того, как активность начинает снижаться. В зависимости от промотора оказывается, что отдельные элементы могут функционировать или кооперативно или независимо, активируя транскрипцию.

Примером промотора, который способен экспрессировать трансген CAR в Т-клетке млекопитающего, является промотор EF1a. Нативный промотор EF1a управляет экспрессией альфа-субъединицы комплекса фактора элонгации 1, который ответственен за ферментную доставку аминоксил-тРНК в рибосому. Промотор широко используется в экспрессирующих плаزمидных млекопитающих, и как показано, эффективен при управлении экспрессии CAR от трансгенов, клонированных в лентивирусный вектор. См., например, Milone et al., Mol. Ther., 17(8): 1453-1464 (2009). В одном аспекте промотор EF1a включает последовательность, предоставленную как SEQ ID NO: 11.

Другим примером промотора является последовательность немедленно раннего цитомегаловирусного (CMV) промотора. Такая промоторная последовательность представляет собой сильную конститутивную промоторную последовательность, способную запустить высокие уровни экспрессии любой нуклеотидной последовательности, оперативно соединенной с ней. Однако также можно использовать другие конститутивные промоторные последовательности, включая, но не ограничиваясь перечисленным, ранний промотор обезьяньего вируса 40 (SV40), вирус опухоли мышины молочной железы (MMTV), промотор длинного концевой повтора вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), промотор MoMuLV, промотор вируса лейкоза птиц, немедленно ранний промотор вируса Эпштейна-Барра, промотор вируса саркомы Рауса, а также промоторы генов человека, такие как, но без ограничения, актиновый

промотор, миозиновый промотор, промотор фактора элонгации 1 α , гемоглобиновый промотор и креатинкиназный промотор. Кроме того, изобретение не должно ограничиваться применением конститутивных промоторов. Индуцируемые промоторы также рассматриваются как часть изобретения. Применение индуцируемого промотора

5 обеспечивает молекулярный переключатель, способный запускать экспрессию нуклеотидной последовательности, которая оперативно соединена с ним, когда такая экспрессия желательна, или выключать экспрессию, когда такая экспрессия нежелательна. Примеры индуцируемых промоторов включают, но не ограничиваются перечисленным, металлотионинный промотор, глюкокортикоидный промотор,

10 прогестероновый промотор и тетрациклиновый промотор.

Другим примером промотора является фосфоглицераткиназный (PGK) промотор. В воплощениях может быть желателен усеченный PGK промотор (например, PGK промотор с одной или несколькими, например, 1, 2, 5, 10, 100, 200, 300 или 400 делециями нуклеотидов, при сравнении с последовательностью PGK промотора дикого типа).

15 Нуклеотидные последовательности примеров PGK промоторов приводятся ниже.

Промотор WT PGK

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGA
GGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGC
GGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGCGCGGG
20 ACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCTGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACGAG
GGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAGTG
CAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCCTTGGAAGGGCTGAATCCCCGCCTCGTCCTTCG
CAGCGGCCCCCGGGTGTTCCTCATCGCCGCTTCTAGGCCCACTGCGACGCTTGCCTG
CACTTCTTACACGCTCTGGGTCCCAGCCGCGGCGACGCAAAGGGCCTTGGTGCGGG
25 TCTCGTCGGCGCAGGGACGCGTTTGGGTCCCGACGGAACCTTTTCCGCGTTGGGGTT
GGGGCACCATAAGCT

(SEQ ID NO: 487)

Примеры усеченных PGK промоторов

PGK100:

30 ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGA
GGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGC
GGGGTG

(SEQ ID NO: 488)

PGK200:

35 ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGA
GGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGC
GGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGCGCGGG
ACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCTGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACG

(SEQ ID NO: 489)

40 PGK300:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGA
GGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGC
GGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGCGCGGG
ACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCTGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACGAG
45 GGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAGTG
CAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCCTTGGAAGGGCTGAATCCCCG

(SEQ ID NO: 490)

PGK400:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGA
 GGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGC
 GGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGCGCGGG
 ACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACGAG
 5 GGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAGTG
 CAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCTTGGAAGGGCTGAATCCCCGCCTCGTCCTTCG
 CAGCGGCCCCCGGGTGTTCCTCGCCGCTTCTAGGCCCACTGCGACGCTTGCCTG
 CACTTCTTACACGCTCTGGGTCCCAGCCG
 (SEQ ID NO: 491)

10 Также может быть включен вектор, например, сигнальная последовательность, для облегчения секреции, сигнал полиаденилирования и терминатор транскрипции (например, из гена бычьего гормона роста (BGH)), элемент, делающий возможной эписомальную репликацию и репликацию в прокариотах (например, ориджин SV40 и ColE1, или другие, известные в технике), и/или элементы для возможности селекции
 15 (например, ген устойчивости к ампициллину и/или зеоциновый маркер).

Для того, чтобы оценить экспрессию полипептида CAR или его частей, экспрессирующий вектор, который вводят в клетку, также может содержать или ген селектируемый маркер или репортерный ген или тот и другой для облегчения идентификации и селекции экспрессирующих клеток из популяции клеток, найденных
 20 как трансфицированные или инфицированные через вирусные векторы. В других аспектах селектируемый маркер может находиться на отдельной части ДНК и использоваться в процедуре котрансфекции. Как селектируемые маркеры, так и репортерные гены могут быть фланкированы соответствующими регуляторными последовательностями для возможности экспрессии в клетках-реципиентах. Применимые
 25 селектируемые маркеры включают, например, гены устойчивости к антибиоткам, такие как нео, и подобные.

Репортерные гены используются для идентификации потенциально трансфицированных клеток и для оценки функциональности регуляторных последовательностей. Вообще репортерный ген представляет собой ген, который не
 30 присутствует или не экспрессируется организмом или тканью реципиента, и который кодирует полипептид, экспрессия которого обнаруживается по легко детектируемому свойству, например, ферментативной активности. Экспрессию репортерного гена проверяют в подходящее время после того, как ДНК введена в клетки реципиента. Подходящие репортерные гены могут включать гены, кодирующие люциферазу, бета-
 35 галактозидазу, хлорамфениколацетилтрансферазу, секретированную щелочную фосфатазу, или ген зеленого флуоресцентного белка (см., например, Ui-Tei et al., 2000, FEBS Letters, 479: 79-82). Подходящие системы для экспрессии хорошо известны и могут быть получены с использованием известных методов или получены коммерчески. Как правило, конструкцию с минимальным 5'-фланкирующим участком, показывающую
 40 наивысший уровень экспрессии репортерного гена, идентифицируют как промотор. Такие промоторные участки могут быть соединены с репортерным геном и использованы для оценки агентов на способность модулировать транскрипцию, управляемую промотором.

В одном воплощении вектор дополнительно может включать нуклеиновую кислоту,
 45 кодирующую второй CAR. В одном воплощении второй CAR включает антигенсвязывающий домен для мишени, экспрессированной на клетках острого миелоидного лейкоза, такой как, например, CD123, CD33, CD34, FLT3 или фолатный рецептор бета. В одном воплощении вектор включает нуклеотидную

последовательность, кодирующую первый CAR, который специфически связывает первый антиген, и включает внутриклеточный сигнальный домен, имеющий костимулирующий сигнальный домен, но не первичный сигнальный домен, и нуклеиновую кислоту, кодирующую второй CAR, который специфически связывает второй отличный от первого антиген, и включает внутриклеточный сигнальный домен, имеющий первичный сигнальный домен, но не костимулирующий сигнальный домен. В одном воплощении вектор включает нуклеиновую кислоту, кодирующую первый CLL-1-CAR, который включает анти-CLL-1 связывающий домен, трансмембранный домен и костимулирующий домен, и нуклеиновую кислоту, кодирующую второй CAR, который специфически связывает второй антиген иной, чем CLL-1 (например, антиген, экспрессированный на клетках AML, например, CD123, CD33, CD34, FLT3 или фолатный рецептор бета), и включает антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и первичный сигнальный домен. В другом воплощении вектор включает нуклеиновую кислоту, кодирующую первый CLL-1-CAR, который включает анти-CLL-1 связывающий домен, трансмембранный домен и первичный сигнальный домен, и нуклеиновую кислоту, кодирующую второй CAR, который специфически связывает второй антиген иной, чем CLL-1 (например, антиген, экспрессированный на клетках AML, например, CD123, CD33, CD34, FLT3 или фолатный рецептор бета), и включает антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и костимулирующий сигнальный домен.

В одном воплощении вектор включает нуклеиновую кислоту, кодирующую CLL-1-CAR, описанный в настоящем описании, и нуклеиновую кислоту, кодирующую ингибирующий CAR. В одном воплощении ингибирующий CAR включает антигенсвязывающий домен, который связывает антиген, обнаруженный на здоровых клетках, но не на раковых клетках, например, здоровых клетках, которые также экспрессируют CLL. В одном воплощении ингибирующий CAR включает антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен ингибирующей молекулы. Например, внутриклеточный сигнальный домен ингибирующего CAR может представлять собой внутриклеточный домен PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, ГКГС класса I, ГКГС класса II, GAL9, аденозин и TGFR-бета.

В воплощениях вектор может включать две или больше нуклеотидных последовательностей, кодирующих CAR, например, CLL-1-CAR, описанный в настоящем описании, и второй CAR, например, ингибирующий CAR, который специфически связывается с антигеном иным, чем CLL-1 (например, антигеном, экспрессированным на клетках AML, например, CD123, CD33, CD34, FLT3 или фолатным рецептором бета). В таких воплощениях две или более нуклеотидных последовательностей кодирующих CAR, кодированы одной нуклеиновой молекулой в той же рамке считывания, что и одна полипептидная цепь. В таком аспекте два или больше CAR могут, например, разделяться одним или несколькими сайтами расщепления пептида (например, сайтом ауторасщепления или субстрата для внутриклеточной протеазы). Примеры сайтов расщепления пептидов включают указанные далее, где остатки GSG являются необязательными.

T2A: (GSG) E G R G S L L T C G D V E E N P G P (SEQ ID NO: 492)
 P2A: (GSG) A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P (SEQ ID NO: 493)
 E2A: (GSG) Q C T N Y A L L K L A G D V E S N P G P (SEQ ID NO: 494)
 F2A: (GSG) V K Q T L N F D L L K L A G D V E S N P G P (SEQ ID NO: 495)

Способы введения и экспрессии генов в клетке известны в технике. В контексте экспрессирующего вектора вектор можно легко ввести в клетку-реципиента, например, млекопитающего, бактериальную, дрожжевую клетку или клетку насекомого, любым способом, известным в технике. Например, экспрессирующий вектор можно перенести

в клетку-реципиента физическими, химическими или биологическими способами. Физические способы введения полинуклеотида в клетку-реципиента включают кальцийфосфатную преципитацию, липофекцию, бомбардировку частицами, микроинъекцию, электропорацию и подобные способы. Способы получения клеток, включающих векторы и/или экзогенные нуклеиновые кислоты, хорошо известны в

технике. См., например, Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY. Предпочтительным способом введения полинуклеотида в клетку-реципиента является кальцийфосфатная трансфекция. Биологические способы введения полинуклеотида в клетку-реципиента включают использование ДНК- и РНК-векторов. Вирусные векторы, в особенности, ретровирусные

векторы, стали наиболее широко используемым способом встраивания генов в клетки млекопитающих, например, клетки человека. Другие вирусные векторы можно получить из лентивируса, поксвирусов, вируса простого герпеса I, аденовирусов, аденоассассиированных вирусов и т.п. См., например, пат. США №№ 5350674 и 5585362. Химические средства введения полинуклеотида в клетку-реципиента включают коллоидные дисперсные системы, такие как макромолекулярные комплексы, нанокapsулы, микросферы, гранулы и системы на основе липидов, включая эмульсии

масло-в-воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Примером коллоидной системы для применения в качестве среды для доставки *in vitro* и *in vivo* является липосома (например, искусственная мембранная везикула). Доступны другие способы искусственной таргетной доставки нуклеиновых кислот, такие как доставка полинуклеотидов таргетными наночастицами, или другая подходящая система доставки субмикронного размера. В случае, когда используют невирусную систему доставки, примером среды для доставки является липосома. Предполагается применение липидных композиций для введения нуклеиновых кислот в клетку-реципиента (*in vitro*, *ex vitro* или *in vivo*). В другом аспекте нуклеиновая кислота может быть ассоциирована с липидом. Нуклеиновая кислота, ассоциированная с липидом, может быть инкапсулирована в водную внутреннюю часть липосомы, помещена в липидный бислой липосомы, присоединена к липосоме через молекулу, которая ассоциирована как с липосомой, так и с олигонуклеотидом, захвачена в липосому, включена в комплекс с липосомой, диспергирована в растворе, содержащем липид, смешана с липидом, объединена с липидом, содержаться в виде суспензии в липиде, содержаться или образовывать комплекс с мицеллой или иначе ассоциирована с липидом. Липидные, липидные/ДНК или ассоциированные липидные/экспрессирующий вектор композиции не ограничиваются какой-либо определенной структурой в растворе. Например, они могут присутствовать в двухслойной структуре, в виде мицелл или «сплюсненной» структуры. Они также могут быть помещены в раствор, возможно, с образованием агрегатов, которые неоднородны по размеру или форме. Липиды представляют собой жирные вещества, которые могут встречаться в природе, или синтетические липиды. Например, липиды включают жирные капли, которые встречаются в природе в цитоплазме, а также класс соединений, которые содержат длинноцепные алифатические углеводороды и их производные, такие как жирные кислоты, спирты, амины, аминокислоты и альдегиды.

Липиды, подходящие для применения, можно получить из коммерческих источников.

Например, димиристилфосфатидилхолин («DMPC») можно получить от Sigma, St. Louis, MO; дицетилфосфат («DCP») можно получить от K & K Laboratories (Plainview, NY); холестерин («Choi») можно получить от Calbiochem-Behring;

димеристилфосфатидилглицерол («DMPG») и другие липиды можно получить от Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL.). Исходные растворы липидов в хлороформе или смеси хлороформ/метанол можно хранить при примерно -20°C. Хлороформ используют как единственный растворитель, так как его легче выпарить, чем метанол. «Липосома» является общим термином, включающим различные одно- и многослойные липидные везикулы, образованные путем получения замкнутых липидных бислоев или агрегатов. Липосомы можно охарактеризовать как имеющие везикулярные структуры с фосфолипидной двуслойной мембраной и внутренней водной средой. Многослойные липосомы имеют несколько липидных слоев, разделенных водной средой. Они образуются спонтанно, когда фосфолипиды суспендируют в избытке водного раствора. Липидные компоненты претерпевают самоперегруппировку перед образованием закрытых структур и захватывают воду и растворенные вещества между липидными бислоями (Ghosh et al., 1991, *Glycobiology*, 5: 505-10). Однако композиции, которые имеют в растворе структуры иные, чем обычная везикулярная структура, также охватываются. Например, липиды могут принимать мицеллярную структуру или существовать только в виде неоднородных агрегатов липидных молекул. Также рассматриваются комплексы липофектамин-нуклеиновая кислота.

Независимо от способа, используемого для введения экзогенных нуклеиновых кислот в клетку-реципиента, или иного представления клетки ингибитору по настоящему изобретению, для того, чтобы подтвердить присутствие последовательности рекомбинантной ДНК в клетке-реципиенте, можно выполнить ряд анализов. Такие анализы включают, например, «молекулярные биологические» анализы, хорошо известные специалистам в данной области техники, такие как саузерн- или нозерн-блоттинг, ОТ-ПЦР и ПЦР; «биохимические» анализы, такие как обнаружение присутствия или отсутствия определенного пептида, например, иммунологическими средствами (ELISA и вестерн-блоттинг), или анализами, описанными в настоящем описании для идентификации агентов, попадающих в объем изобретения.

Настоящее изобретение также относится к вектору, включающему кодирующую CAR молекулу нуклеиновой кислоты. В одном аспекте вектор CAR может быть непосредственно введен в клетку, например, иммунную эффекторную клетку, например, Т- или НК-клетку. В одном аспекте вектор является клонирующим или экспрессирующим вектором, например, вектором, включающим, но без ограничения, одну или несколько плазмид (например, экспрессирующие плазмиды, клонирующие векторы, миникруги, минивекторы, двойные микрохромосомы), ретровирусные и лентивирусные векторные конструкции. В одном аспекте вектор способен к экспрессии конструкции CAR в Т-клетках млекопитающего. В одном аспекте Т-клетки млекопитающего являются Т-клетками человека.

Источники клеток

Перед экспансией и генетической модификацией получают у субъекта источник клеток (например, иммунных эффекторных клеток, например, Т- или НК-клеток). Термин «субъект», как предполагается, включает живые организмы, у которых можно вызывать иммунную реакцию (например, млекопитающих). Примеры субъектов включают людей, собак, мышей, крыс и их трансгенные виды. Получить Т-клетки можно из ряда источников, включая моноклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатического узла, пуповинную кровь, ткань тимуса, ткань из

места инфекции, асциты, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли.

В некоторых аспектах настоящего изобретения можно использовать любой ряд линий эффекторных клеток (например, Т- или NK-клеток), доступных в технике. В некоторых аспектах настоящего изобретения Т-клетки можно получить из порции крови, собранной у субъекта, с использованием любого из ряда методов, известных специалистам в данной области техники, таких как сепарация с фиколлом™. В одном предпочтительном аспекте клетки из кровотока индивидуума получают аферезом. Продукт афереза обычно содержит лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядросодержащие белые клетки крови, красные клетки крови и тромбоциты. В одном аспекте клетки, собранные аферезом, можно промыть для удаления фракции плазмы и поместить клетки в соответствующий буфер или среды для последующих стадий обработки. В одном аспекте изобретения клетки промывают забуференным фосфатом физиологическим раствором (PBS). В альтернативном аспекте раствор для промывки не содержит кальций и может не содержать магний, или может быть лишен многих, если не всех, двухвалентных катионов. Начальные стадии активации в отсутствие кальция могут привести к увеличенной активации. Как легко признать специалистам в данной области техники, стадию промывки можно выполнять способами, известными в технике, такими как с использованием полуавтоматизированной «проточной» центрифуги (например, процессора клеток Cobe 2991, Baxter CytoMate или Haemonetics Cell Saver 5), согласно инструкциям изготовителя. После промывки клетки можно ресуспендировать в различных биосовместимых буферах, таких как, например, PBS без Ca и без Mg, PlasmaLyte A или другой солевой раствор с буфером или без. С другой стороны, нежелательные компоненты образца после афереза можно удалить, и непосредственно ресуспендировать клетки в культуральных средах.

Выяснено, что в способах по заявке можно использовать условия выращивания в средах, включающие 5% или меньше, например, 2%, человеческой сыворотки АВ и использовать известные условия выращивания в средах и композиции, например, описанные в работе Smith *et al.*, «Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement», *Clinical & Translational Immunology* (2015), 4, e31; doi:10.1038/cti.2014.31.

В одном аспекте Т-клетки выделяют из лимфоцитов периферической крови путем лизиса красных клеток крови и деплеции моноцитов, например, путем центрифугирования в градиенте PERCOLL™ или путем отстаивания в противоточной центрифуге. Специфическую субпопуляцию Т-клеток, такую как клетки CD3+, CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и CD45RO+T, можно выделить дополнительно методами положительной или отрицательной селекции. Например, в одном аспекте Т-клетки выделяют путем инкубации с анти-CD3/анти-CD28 (например, 3×28) конъюгированными гранулами, такими как DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, в течение времени, достаточного для положительной селекции нужных Т-клеток. В одном аспекте период времени составляет примерно 30 минут. В другом аспекте период времени колеблется от 30 минут до 36 часов или дольше, и все промежуточные величины. В еще одном предпочтительном аспекте период времени составляет 10-24 часа. В одном аспекте время инкубации составляет 24 часа. Более длительное время инкубации можно использовать для выделения Т-клеток в любой ситуации, где имеется несколько Т-клеток, которые сравнивают с другими типами клеток, таких как при выделении опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) из опухолевой ткани или от индивидуумов с ослабленным иммунитетом. Кроме того, использование более длительного времени инкубации может повысить эффективность захвата CD8+ Т-клеток.

Таким образом, просто за счет сокращения или удлинения времени, Т-клеткам дают возможность связываться с CD3/CD28-гранулами, и/или путем уменьшения или увеличения отношения гранул к Т-клеткам (как описано в настоящем описании далее), можно преимущественно отобрать субпопуляции Т-клеток для или против инициации культивирования или в другие моменты времени во время процесса. Кроме того, путем уменьшения или увеличения отношения анти-CD3/анти-CD28 антител на гранулах или другой поверхности можно преимущественно отобрать субпопуляции Т-клеток для или против инициации культивирования или в другие нужные моменты времени. Специалисты в данной области техники поймут, что в контексте настоящего изобретения также можно использовать несколько циклов селекции. В некоторых аспектах может быть желательно выполнение процедуры селекции и использование «невыделенных» клеток в процессе активации и экспансии. «Невыделенные» клетки также можно подвергнуть дополнительным циклам селекции.

Обогащение Т-клеточной популяции путем отрицательной селекции можно выполнить с помощью комбинации антител, направленных на маркеры поверхности, уникальные для отрицательно выделенных клеток. Одним из способов является сортинг клеток и/или селекция через отрицательную магнитную иммуноадгезию или проточную цитометрию, в которых используется коктейль из моноклональных антител, направленных на маркеры клеточной поверхности, присутствующие на отрицательно выделенных клетках. Например, для обогащения в отношении CD4+ клеток путем отрицательной селекции коктейль из моноклональных антител типично включает антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. В некоторых аспектах может быть желательно обогащение в отношении положительно выделенных регуляторных Т-клеток, которые типично экспрессируют CD4+, CD25+, CD62Lhi, GITR+ и FoxP3+. С другой стороны, в некоторых аспектах регуляторные Т-клетки истощаются гранулами, конъюгированными с анти-CD25, или другим подобным способом селекции.

Способы, описанные в настоящем описании, могут включать, например, селекцию специфической субпопуляции иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток, которые представляют собой популяцию, истощенную регуляторными Т-клетками, клетки, истощенные CD25+, с использованием, например, метода отрицательной селекции, например, описанного в настоящем описании. Предпочтительно популяция, истощенная регуляторными Т-клетками, содержит менее 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% CD25+ клеток.

В одном воплощении регуляторные Т-клетки, например, CD25+ Т-клетки, удаляют из популяции с использованием анти-CD25 антитела или его фрагментов, или CD25-связывающего лиганда IL-2. В одном воплощении анти-CD25 антитело или его фрагмент или CD25-связывающий лиганд конъюгированы с субстратом, например, гранулой, или иначе нанесены на субстрат, например, гранулу. В одном воплощении анти-CD25 антитело или его фрагмент конъюгированы с субстратом, как описано в настоящем описании.

В одном воплощении регуляторные Т-клетки, например, CD25+ Т-клетки, удаляют из популяции с использованием CD25-истощающего реагента от Miltenyi™. В одном воплощении отношение клеток к CD25-истощающему реагенту составляет 1e7 клеток к 20 мкл, или 1e7 клеток к 15 мкл, или 1e7 клеток к 10 мкл, или 1e7 клеток к 5 мкл, или 1e7 клеток к 2,5 мкл, или 1e7 клеток к 1,25 мкл. В одном воплощении, например, для регуляторных Т-клеток, например, деплеции CD25+, используют более 500 миллионов клеток на мл. В другом аспекте используют концентрацию клеток 600, 700, 800 или 900 миллионов клеток на мл.

В одном воплощении популяция иммунных эффекторных клеток, которые истощаются, включает примерно 6×10^9 CD25+ Т-клеток. В других аспектах популяция иммунных эффекторных клеток, которые истощаются, включает примерно 1×10^9 - 1×10^{10} CD25+ Т-клеток и любую целую величину в промежутке. В одном воплощении полученная популяция истощенных регуляторных Т-клеток имеет 2×10^9 регуляторных Т-клеток, например, CD25+ клеток, или меньше (например, 1×10^9 , 5×10^8 , 1×10^8 , 5×10^7 , 1×10^7 CD25+ клеток).

В одном воплощении регуляторные Т-клетки, например, CD25+ клетки, удаляют из популяции с использованием системы CliniMAC с тубинг-набором для истощения клеток, таким как тубинг 162-01. В одном воплощении система CliniMAC представляет серию для настройки на истощение, такую как, например, DEPLETION2.1.

Без желания привязываться к какой-либо определенной теории, снижение уровня отрицательных регуляторов иммунных клеток (например, снижение числа нежелательных иммунных клеток, например, T_{REG}-клеток) у субъекта перед аферезом или во время изготовления продукта CAR-экспрессирующих клеток может уменьшить опасность рецидива у субъекта. Например, способы истощения T_{REG}-клеток известны в технике. Способы уменьшения T_{REG}-клеток включают, но не ограничиваются перечисленным, циклофосфамид, анти-GITR антитела (анти-GITR антитела, описанные в настоящем описании), истощение CD25 и их комбинации.

В некоторых воплощениях способы изготовления включают уменьшение числа (например, истощение) T_{REG}-клеток перед изготовлением CAR-экспрессирующей клетки. Например, способы изготовления включают контактирование образца, например, аферезного образца, с анти-GITR антителом и/или анти-CD25 антителом (или их фрагментом, или CD25-связывающим лигандом), например, для истощения T_{REG}-клеток перед изготовлением CAR-экспрессирующего клеточного продукта (например, Т-клеток, НК-клеток).

В одном воплощении субъекта предварительно лечат одной или несколькими терапиями, которые уменьшают число T_{REG}-клеток, перед сбором клеток для изготовления CAR-экспрессирующего клеточного продукта, посредством чего у субъекта снижается опасность рецидива на лечение CAR-экспрессирующими клетками. В одном воплощении способы уменьшения числа T_{REG}-клеток включают, но не ограничиваются перечисленным, введение субъекту одной или нескольких позиций из циклофосфамида, анти-GITR антитела, истощения CD25 или их комбинации. Введение одной или нескольких позиций из циклофосфамида, анти-GITR антитела, истощения CD25 или их комбинации может иметь место до, во время или после инфузии CAR-экспрессирующего клеточного продукта.

В одном воплощении субъекта предварительно лечат циклофосфамидом перед сбором клеток для CAR-экспрессирующего клеточного продукта, посредством чего у субъекта снижается опасность рецидива на лечение CAR-экспрессирующими клетками. В одном воплощении субъекта предварительно лечат анти-GITR антителами перед сбором клеток для CAR-экспрессирующего клеточного продукта, посредством чего у субъекта снижается опасность рецидива на лечение CAR-экспрессирующими клетками.

В одном воплощении популяция клеток, которые удаляют, не представляет ни регуляторные Т-клетки, ни опухолевые клетки, но клетки, которые иначе отрицательно влияют на экспансию и/или функцию CART-клеток, например, клетки, экспрессирующие

CD14, CD11b, CD33, CD15 или другие маркеры, экспрессируемые возможно иммуносупрессивными клетками. В одном воплощении такие клетки намечают для удаления вместе с регуляторными Т-клетками и/или опухолевыми клетками или после указанного истощения или в другом порядке.

5 Способы, описанные в настоящем описании, могут включать более одной стадии селекции, например, более одной стадии истощения. Обогащение Т-клеточной популяции путем отрицательной селекции можно выполнить, например, с помощью комбинации антител, направленных на маркеры поверхности, уникальные для отрицательно выделяемых клеток. Одним из способов является сортинг клеток и/или селекция через
10 отрицательную магнитную иммуноадгезию или проточную цитометрию, в которых используется коктейль из моноклональных антител, направленных на маркеры клеточной поверхности, присутствующие на отрицательно выделенных клетках. Например, для обогащения в отношении CD4+ клеток путем отрицательной селекции коктейль из моноклональных антител может включать антитела к CD14, CD20, CD11b,
15 CD16, HLA-DR и CD8.

Способы, описанные в настоящем описании, также могут включать удаление клеток из популяции, которая экспрессирует опухолевый антиген, например, опухолевый антиген, который не включает CD19, CD30, CD38, CD123, CD20, CD14 или CD11b, посредством чего получают популяцию, истощенную регуляторными Т-клетками,
20 например, истощенную CD25+, и с клетками, истощенными опухолевым антигеном, которые подходят для экспрессии CAR, например, CAR, описанного в настоящем описании. В одном воплощении экспрессирующие опухолевый антиген клетки удаляют одновременно с регуляторными Т-клетками, например, CD25+ клетками. Например, анти-CD25 антитело или его фрагмент и антитело против опухолевого антигена или
25 его фрагмент можно присоединить к одному и тому же субстрату, например, грануле, который можно использовать для удаления клеток, или анти-CD25 антитело или его фрагмент или антитело против опухолевого антигена или его фрагмент можно присоединить к отдельным гранулам, смесь которых можно использовать для удаления клеток. В других воплощениях удаление регуляторных Т-клеток, например, CD25+
30 клеток, и удаление экспрессирующих опухолевый антиген клеток следуют одно за другим и могут происходить, например, в любом порядке.

Также предлагаются способы, которые включают удаление клеток из популяции, которая экспрессирует реперный ингибитор, например, реперный ингибитор, описанный в настоящем описании, например, один или несколько из PD1+ клеток, LAG3+ клеток
35 и TIM3+ клеток, посредством чего получают популяцию истощенных Т-регуляторных, например, истощенных CD25+ клеток, и клетки, истощенные реперным ингибитором, например, PD1+, LAG3+ и/или TIM3+. Примеры реперных ингибиторов включают PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (e.g., CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4
40 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, ГКГС класса I, ГКГС класса II, GAL9, аденозин и TGFR-бета. В одном воплощении клетки, экспрессирующие реперный ингибитор, удаляют одновременно с регуляторными Т-клетками, например, CD25+ клетками. Например, анти-CD25 антитело или его фрагмент и антитело против реперного ингибитора или его фрагмент можно присоединить к одной и той же грануле, которую
45 можно использовать для удаления клеток, или анти-CD25 антитело или его фрагмент или антитело против реперного ингибитора или его фрагмент можно присоединить к отдельным гранулам, смесь которых можно использовать для удаления клеток. В других воплощениях удаление регуляторных Т-клеток, например, CD25+ клеток, и

удаление экспрессирующих реперный ингибитор клеток следуют одно за другим и могут происходить, например, в любом порядке.

В одном воплощении можно выбрать популяцию Т-клеток, которая экспрессирует один или несколько из IFN- γ , TNF α , IL-17A, IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-13, гранзима В и перфорины, или другие соответствующие молекулы, например, другие цитокины. Способы скрининга на экспрессию клеток можно определить, например, способами, описанными в публикации РСТ № WO 2013/126712.

Для выделения нужной популяции клеток путем положительной или отрицательной селекции концентрация клеток и поверхность (например, частиц, таких как гранулы) могут изменяться. В некоторых аспектах может быть желательно существенно уменьшить объем, в котором гранулы и клетки смешиваются вместе (например, увеличить концентрацию клеток), для гарантии максимального контакта клеток и гранул. Например, в одном аспекте используют концентрацию клеток 1 миллиард на мл. В другом аспекте используют свыше 100 миллионов клеток на мл. В другом аспекте используют концентрацию клеток 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, или 50 миллионов клеток на мл. В еще одном аспекте используют концентрацию клеток 75, 80, 85, 90, 95 или 100 миллионов клеток на мл. В других аспектах используют концентрации 125 или 150 миллионов клеток. Использование высоких концентраций может привести к повышенному выходу, активации клеток и экспансии клеток. Кроме того, использование высоких концентраций клеток дает возможность более эффективного захвата клеток, которые могут слабо экспрессировать антигены-мишени, представляющие интерес, таких как CD28-отрицательные Т-клетки, или из образцов, где присутствует много опухолевых клеток (например, лейкозной крови, опухолевой ткани и т.д.). Такие популяции клеток могут иметь терапевтическую ценность, и может быть желательно их получение. Например, использование высоких концентраций клеток дает возможность более эффективной селекции CD8⁺ Т-клеток, которые обычно имеют слабую экспрессию CD8.

В родственном аспекте может быть желательно использовать меньшие концентрации клеток. Путем значительного разбавления смеси Т-клеток и поверхностных частиц (например, частиц, таких как гранулы) взаимодействия между частицами и клетками сводят к минимуму. Это выбор для клеток, которые экспрессируют большие количества нужных антигенов, которые связываются с частицами. Например, CD4⁺ Т-клетки экспрессируют высокие уровни CD28 и захватываются более эффективно, чем CD8⁺ клетки в меньших концентрациях. В одном аспекте концентрация используемых клеток составляет 5 $\times$ 10⁶/мл. В других аспектах используемая концентрация может составлять от примерно 1 $\times$ 10⁵/мл до 1 $\times$ 10⁶/мл и любую целую величину в промежутке.

В других аспектах клетки могут быть ингибированы во вращательном устройстве для изменения длительности при различных скоростях или при 2-10 $^{\circ}$ C или при комнатной температуре.

Для стимуляции Т-клетки также можно заморозить после стадии промывки. Без связи с какой-либо теорией, замораживание и последующая стадия оттаивания дают более однородный продукт за счет удаления из клеточной популяции гранулоцитов и до некоторой степени моноцитов. После стадии промывки, которая удаляет плазму и тромбоциты, клетки можно суспендировать в растворе для замораживания. Хотя в технике известны и будут применяться в настоящем контексте многие растворы для замораживания и параметры, один из способов включает использование PBS, содержащего 20% ДМСО и 8% человеческого сывороточного альбумина, или среды для выращивания, содержащие 10% декстрана 40 и 5% декстрозы, 20% человеческого

сывороточного альбумина и 7,5% ДМСО, или 31,25% плазмалита-А, 31,25% декстрозы, 0,45% NaCl, 10% декстрана 40 и 5% декстрозы, 20% человеческого сывороточного альбумина и 7,5% ДМСО, или другие подходящие среды для замораживания клеток, содержащие, например, геспан и ПлазмаЛит А, затем клетки замораживают при -80°C со скоростью 1° в минуту и хранят в емкости для хранения в парах жидкого азота. Можно использовать другие способы управляемого замораживания, а также неуправляемого замораживания сразу до -20°C или в жидком азоте.

В некоторых аспектах криоконсервированные клетки оттаивают и промывают, как описано в настоящем описании, и оставляют на один час при комнатной температуре перед активацией с использованием способов по настоящему изобретению.

В контексте изобретения также рассматривается взятие образцов крови или продукта афереза у субъекта в период времени до того, когда размноженные клетки, описанные в настоящем описании, могут понадобиться. Как таковой, источник клеток для размножения может быть собран в любой необходимый момент времени, и нужные клетки, такие как иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки или НК-клетки, выделяют и замораживают для более позднего использования в клеточной терапии, например, Т-клеточной терапии, для любого ряда заболеваний или состояний, которые могут получить благоприятный эффект от клеточной терапии, например, Т-клеточной терапии, такие, как описанные в настоящем описании. В одном аспекте образец крови или афереза берут у генетически здорового субъекта. В некоторых воплощениях образец крови или афереза берут у вообще здорового субъекта, который имеет опасность развития у него заболевания, но у которого заболевание еще не развилось, и клетки, представляющие интерес, выделяют и замораживают для более позднего использования. В некоторых аспектах иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки или НК-клетки, могут быть размножены, заморожены и использованы позднее. В некоторых аспектах образцы берут у пациента вскоре после диагноза определенного заболевания, описанного в настоящем описании, но до какого-либо лечения. В другом аспекте клетки выделяют из образца крови или афереза субъекта перед любым числом релевантных способов лечения, включая, но не ограничиваясь перечисленным, лечение такими средствами, как натализумаб, эфализумаб, противовирусные средства, химиотерапию, облучение, лечение иммуносупрессивными средствами, такими как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, микофенолат и FK506, антителами или другими иммуноаблативными средствами, такими как САМРАТН, анти-CD3-антитела, цитоксан, флударбин, циклоспорин, FK506, рапамицин, микофеноловая кислота, стероиды, FR901228, и облучение.

В другом аспекте настоящего изобретения Т-клетки получают от пациента непосредственно после лечения, после которого у субъекта остаются функциональные Т-клетки. В этом отношении отмечено, что после некоторых видов лечения рака, в частности, лечения лекарственными средствами, которые причиняют вред иммунной системе, вскоре после лечения в течение периода, когда пациенты могут естественно восстанавливаться от лечения, качество полученных Т-клеток может быть оптимальным или улучшенным в отношении их способности размножаться *ex vivo*. Подобным образом, после манипуляции *ex vivo* с использованием способов, описанных в настоящем описании, такие клетки могут находиться в предпочтительном состоянии для усиленной прививки и экспансии *in vivo*. Таким образом, в контексте настоящего изобретения рассматривается собирание клеток крови, включая Т-клетки, дендритные клетки или другие клетки гемопоэтической линии дифференцировки, во время такой фазы восстановления. Далее, в некоторых аспектах мобилизацию (например, с GM-CSF) и

установление режимов можно использовать для создания состояния у субъекта, которое содействует репопуляции, рециркуляции, регенерации и/или экспансии определенных типов клеток, в особенности, во время определенного временного окна после терапии. Характерные типы клеток включают Т-клетки, В-клетки, дендритные клетки и другие клетки иммунной системы.

В одном воплощении иммунные эффекторные клетки, экспрессирующие молекулу CAR, например, молекулу CAR, описанную в настоящем описании, получают от субъекта, который получил малую усиливающую иммунитет дозу ингибитора mTOR. В одном воплощении популяцию иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток, сконструированных для экспрессии CAR, харвестировать через достаточный промежуток времени или после достаточной дозировки малой усиливающей иммунитет дозы ингибитора mTOR, так что уровень PD1 отрицательных иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток, или отношение PD1 отрицательные иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки/PD1 положительные иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки, у субъекта или харвестированных у субъекта, возрастает, по меньшей мере временно.

В других воплощениях популяцию иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток, которые сконструированы или будут сконструированы для экспрессии CAR, можно обработать *ex vivo* посредством контакта с количеством ингибитора mTOR, которое повышает число PD1 отрицательных иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток, или повышает отношение PD1 отрицательные иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки/PD1 положительные иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки.

В одном воплощении популяция Т-клеток является дефицитной по диаглицеролкиназе (DGK). Дефицитные по DGK клетки включают клетки, которые не экспрессируют РНК или белок DGK или имеют сниженную или подавленную DGK-активность. Дефицитные по DGK клетки можно получить с помощью генетических подходов, например, введением интерферирующих РНК агентов, например, мРНК, shРНК, miРНК, для снижения или предотвращения экспансии DGK. С другой стороны, DGK-дефицитные клетки можно получить путем обработки ингибиторами DGK, описанными в настоящем описании.

В одном воплощении популяция Т-клеток является дефицитной по Ikaros. Дефицитные по Ikaros клетки включают клетки, которые не экспрессируют РНК или белок Ikaros или имеют сниженную или подавленную активность Ikaros. Дефицитные по Ikaros клетки можно получить с помощью генетических подходов, например, введением интерферирующих РНК агентов, например, мРНК, shРНК, miРНК, для снижения или предотвращения экспрессии Ikaros. С другой стороны, Ikaros-дефицитные клетки можно получить путем обработки ингибиторами Ikaros, например, леналидомидом.

В воплощениях популяция Т-клеток является дефицитной по DGK и дефицитной по Ikaros, например, не экспрессирует DGK и Ikaros или имеет сниженную или подавленную DGK и Ikaros активность. Такие DGK- и Ikaros-дефицитные клетки можно получить любыми способами, описанными в настоящем описании.

В одном воплощении NK-клетки получают от субъекта. В другом воплощении NK-клетки представляют собой NK-клеточную линию, например, клеточную линию NK-92 (Conkwest).

Аллогенный CAR

В воплощениях, описанных в настоящем описании, иммунная эффекторная клетка может быть аллогенной иммунной эффекторной клеткой, например, Т-клеткой или

НК-клеткой. Например, клетка может представлять собой аллогенную Т-клетку, например, аллогенную Т-клетку, утратившую экспрессию функционального Т-клеточного рецептора (TCR) и/или человеческого лейкоцитарного антигена (HLA), например, HLA класса I и/или HLA класса II.

5 Утратившую функциональный TCR Т-клетку можно, например, сконструировать так, что она не экспрессирует какой-либо функциональный TCR на своей поверхности, сконструировать так, что она не экспрессирует одну или больше субъединиц, которые включают функциональный TCR (например, сконструировать так, что она не экспрессирует (или показывает ослабленную экспрессию) TCR-альфа, TCR-бета, TCR-
10 гамма, TCR-дельта, TCR-эпсилон или TCR-дзета), или сконструировать так, что она продуцирует очень мало функционального TCR на своей поверхности. С другой стороны, Т-клетка может экспрессировать по существу ухудшенный TCR, например, экспрессируя мутированные или усеченные формы одной или нескольких субъединиц TCR. Термин «по существу ухудшенный TCR» означает, что такой TCR не будет вызывать вредную
15 иммунную реакцию у реципиента.

Описанная в настоящем описании Т-клетка может быть, например, сконструирована так, что она не экспрессирует HLA на своей поверхности. Например, Т-клетка, описанная в настоящем описании, может быть сконструирована так, что экспрессия HLA на поверхности клетки, например, HLA класса I и/или HLA класса II, регулируется
20 отрицательно. В некоторых аспектах отрицательную регуляцию HLA можно выполнить путем уменьшения или устранения экспрессии бета-2-микроглобулина (B2M).

В некоторых воплощениях Т-клетка может утратить функциональный TCR и функциональный HLA, например, HLA класса I и/или HLA класса II.

Модифицированные Т-клетки, которые утратили экспрессию функционального TCR и/или HLA, можно получить любым подходящим способом, включая нокаут или нокдаун
25 одной или нескольких субъединиц TCR или HLA. Например, Т-клетка может включать нокдаун TCR и/или HLA с использованием мРНК, shРНК, регулярно расположенных группами коротких палиндромных повторов (CRISP), эффекторной нуклеазы, подобной активатору транскрипции (TALEN), или эндонуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN).

30 В некоторых воплощениях аллогенная клетка может представлять собой клетку, которая не экспрессирует или экспрессирует на низких уровнях ингибирующую молекулу, например, клетку, сконструированную любым способом, описанным в настоящем описании. Например, клетка может представлять собой клетку, которая не экспрессирует или экспрессирует на низких уровнях ингибирующую молекулу, например,
35 которая может снижать способность CAR-экспрессирующей клетки поддерживать иммунную эффекторную реакцию. Примеры ингибирующих молекул включают PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, ГКГС класса I, ГКГС класса
40 II, GAL9, аденозин и TGFR-бета. Подавление ингибирующих молекул, например, путем ингибирования на уровне ДНК, РНК или белка, может оптимизировать производительность CAR-экспрессирующей клетки. В воплощениях можно использовать ингибирующую нуклеиновую кислоту, например, ингибирующую нуклеиновую кислоту, например, дцРНК, например, мРНК или shРНК, регулярно расположенные группами
45 короткие палиндромные повторы (CRISP), эффекторную нуклеазу, подобную активатору транскрипции (TALEN), или эндонуклеазу с цинковыми пальцами (ZFN).

мРНК и shРНК для ингибирования TCR или HLA

В некоторых воплощениях экспрессию TCR и/или экспрессию HLA в клетке можно

ингибировать с использованием мРНК или shРНК, которые таргетируют нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR и/или HLA, и/или ингибирующей молекулы, описанной в настоящем описании (например, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, ГКГС класса I, ГКГС класса II, GAL9, аденозина и TGFR-бета).

Экспрессии мРНК и shРНК в Т-клетках можно добиться с использованием любой обычной экспрессирующей системы, например, такой, как лентивирусная экспрессирующая система.

Примеры shРНК, которые отрицательно регулируют экспрессию компонентов TCR, описаны, например, в публикации US № 2012/0321667. Примеры мРНК и shРНК, которые отрицательно регулируют экспрессию генов HLA класса I и/или HLA класса II, описаны, например, в публикации US № 2007/0036773.

CRISPR для ингибирования TCR или HLA

«CRISPR» или «CRISPR для TCR и/или HLA» при использовании в настоящем описании относятся к набору регулярно расположенных группами коротких палиндромных повторов или системе, включающей такой набор повторов. «Cas» при использовании в настоящем описании относится CRISPR-ассоциированному белку. Системой «CRISPR/Cas» называют систему, полученную из CRISPR и Cas, которую можно использовать для сайленсинга или мутирования гена TCR и/или HLA и/или ингибирующей молекулы, описанной в настоящем описании (например, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, ГКГС класса I, ГКГС класса II, GAL9, аденозина и TGFR-бета).

Встречающиеся в природе системы CRISPR/Cas обнаружены в приблизительно 40% секвенированных геномах эубактерий и 90% секвенированных архей. Grissa *et al.* (2007), *BMC Bioinformatics*, 8: 172. Такая система представляет собой тип иммунной системы прокариот, которая предоставляет устойчивость к чужеродным генетическим элементам, таким как плазмиды и фаги, и обеспечивает форму приобретенного иммунитета.

Barrangou *et al.* (2007), *Science*, 315: 1709-1712; Marragini *et al.* (2008), *Science*, 322: 1843-1845.

Система CRISPR/Cas модифицирована для применения при редактировании гена (сайленсинге, усилении или изменении специфических генов) в эукариотах, таких как мыши или приматы. Wiedenheft *et al.* (2012), *Nature*, 482: 331-8. Это осуществляют путем введения в эукариотную клетку плазмиды, содержащей специфически созданный CRISPR и один или несколько соответствующих Cas.

Последовательность CRISPR, иногда называемая локусом CRISPR, включает изменяющиеся повторы и спейсеры. В CRISPR, встречающемся в природе, спейсеры обычно включают последовательности, чужеродные для бактерии, такие как плазмидная или фаговая последовательность; в CRISPR/Cas системе TCR и/или HLA спейсеры получают из генной последовательности TCR или HLA.

РНК из локуса CRISPR конститутивно экспрессируется и процессируется белками Cas в малые РНК. Они включают спейсер, фланкированный повторяющейся последовательностью РНК, направляют другие белки Cas к молчащим экзогенным генетическим элементам на уровне ДНК или РНК. Horvath *et al.* (2010), *Science*, 327: 167-170; Makarova *et al.* (2006), *Biology Direct.*, 1: 7. Таким образом, спейсеры служат в качестве матриц для молекул РНК аналогично мРНК. Pennisi (2013), *Science*, 341: 833-836.

Так как они встречаются в природе во многих различных типах бактерий, точные

порядки CRISPR и структура, функция и ряд генов Cas и их продукт иногда отличаются от вида к виду. Haft *et al.* (2005), *PLoS Comput. Biol.*, 1: e60; Kunin *et al.* (2007), *Genome Biol.*, 8: R61; Mojica *et al.* (2005), *J. Mol. Evol.*, 60: 174-182; Bolotin *et al.* (2005), *Microbiol.*, 151: 2551-2561; Pourcel *et al.* (2005), *Microbiol.*, 151: 653-663; и Stern *et al.* (2010), *Trends Genet.*, 28: 335-340. Например, белки Cse (подтип Cas, *E. coli*) (например, CasA) образуют функциональный комплекс Cascade, который процессирует РНК-транскрипты CRISPR в единицы повтор-спейсер, которые Cascade сохраняет. Brouns *et al.* (2008), *Science*, 321: 960-964. В других прокариотах Cas6 процессирует транскрипт CRISPR. Фаговой активации на основе CRISPR в *E. coli* требуется Cascade и Cas3, но не Cas1 или Cas2.

Белки Cmr (модуль Cas RAMP) в *Pyrococcus furiosus* и других прокариотах образуют функциональный комплекс CRISPR с малыми РНК, который узнает и расщепляет комплементарные РНК-мишени. Более простая система с CRISPR основана на белке Cas9, который представляет собой нуклеазу с двумя активными сайтами разрезания по одному на каждой нити двойной спирали. Комбинирование Cas9 и модифицированной РНК локуса CRISPR можно использовать в системе для редактирования гена. Pennisi (2013), *Science*, 341: 833-836.

Таким образом, систему CRISPR/Cas можно использовать для редактирования гена TCR и/или HLA (добавления или делеции пары оснований) или введения преждевременного прекращения, которое таким образом снижает экспрессию TCR и/или HLA. С другой стороны, систему CRISPR/Cas можно использовать подобно интерференции РНК, выключая ген TCR и/или HLA по обратимому типу. В клетке млекопитающего, например, РНК может направлять белок Cas к промоту TCR и/или HLA, пространственно блокируя РНК-полимеразы.

Можно получить искусственные системы CRISPR/Cas, которые ингибируют TCR и/или HLA, с использованием технологии, известной в технике, например, описанной в публикации US № 20140068797 и в Cong (2013), *Science*, 339: 819-823. Также можно получить другие искусственные системы CRISPR/Cas, которые известны в технике, и которые ингибируют TCR и/или HLA, например, описанные в Tsai (2014), *Nature Biotechnol.*, 32:6, 569-576, и патентах США №№ 8871445, 8865406, 8795965, 8771945 и 8697359.

TALEN для ингибирования TCR и/или HLA

«TALEN» или «TALEN для HLA и/или TCR» или «TALEN для ингибирования HLA и/или TCR» относятся к эффекторной нуклеазе, подобной активатору транскрипции, искусственной нуклеазе, которую можно использовать для редактирования гена HLA и/или TCR, и/или ингибирующей молекуле, описанной в настоящем описании (например, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, ГКГС класса I, ГКГС класса II, GAL9, аденозина и TGFR-бета).

TALEN получают искусственно путем слияния ДНК-связывающего домена TAL-эффектора с доменом расщепления ДНК. Эффекторы, подобные активатору транскрипции (TALE), можно сконструировать для связывания любой нужной ДНК-последовательности, включая часть гена HLA или TCR. Путем объединения сконструированный TALE с доменом расщепления ДНК можно получить рестрикционный фермент, который является специфическим для любой нужной ДНК-последовательности, включая последовательность HLA или TCR. Затем их можно ввести в клетку, в которой их можно использовать для редактирования генома. Boch (2011), *Nature Biotech.*, 29: 135-6; и Boch *et al.* (2009), *Science*, 326: 1509-12; Moscou *et al.* (2009),

Science, 326: 3501.

TALE представляют собой белки, секретированные бактериями *Xanthomonas*. Связывающий домен ДНК содержит повторяющуюся высоко консервативную последовательность 33-34 аминокислот, за исключением 12-ой и 13-ой аминокислот. Эти две позиции являются весьма изменчивыми, показывая высокую корреляцию с узнаванием специфического нуклеотида. Таким образом, их можно сконструировать для связывания с нужной ДНК-последовательностью.

Для того, чтобы получить TALEN, белок TALE гибридизируют с нуклеазой (N), которая представляет собой эндонуклеазу дикого типа или мутированную FokI. Сделано несколько мутаций FokI для ее применения в TALEN; они, например, улучшают специфичность или активность расщепления. Cermak et al. (2011), *Nucl. Acids Res.*, 39: e82; Miller et al. (2011), *Nature Biotech.*, 29: 143-8; Hockemeyer et al. (2011), *Nature Biotech.*, 29: 731-734; Wood et al. (2011), *Science*, 333: 307; Doyon et al. (2010), *Nature Methods*, 8: 74-79; Szczepek et al. (2007), *Nature Biotech.*, 25: 786-793; и Guo et al. (2010), *J. Mol. Biol.*, 200: 96.

Домен FokI функционирует как димер, требующий две конструкции с уникальными ДНК-связывающими доменами для сайтов в геноме мишени с надлежащей ориентацией и размещением. Оказывается, что как число аминокислотных остатков между ДНК-связывающим доменом TALE и доменом расщепления FokI, так и число оснований между двумя отдельными сайтами связывания TALEN являются важными параметрами для достижения высоких уровней активности. Miller et al. (2011), *Nature Biotech.*, 29: 143-8.

TALEN HLA или TCR можно использовать в клетке для получения двухнитевого разрыва (DSB). Можно ввести мутацию в сайт разрыва, если механизмы репарации ошибочно восстанавливают разрыв через соединение с негомولوجичным концом. Например, ошибочная репарация может ввести мутацию сдвига рамки. С другой стороны, чужеродную ДНК можно ввести в клетку вместе с TALEN; в зависимости от последовательностей чужеродной ДНК и хромосомной последовательности, этот процесс можно использовать для исправления дефекта в гене HLA или TCR или введения такого дефекта в wt ген HLA или TCR, снижая таким образом экспрессию HLA или TCR.

TALEN, специфические для последовательностей в HLA или TCR, можно сконструировать с использованием любого способа, известного в технике, включая различные схемы с использованием модульных компонентов. Zhang et al. (2011), *Nature Biotech.*, 29: 149-53; Geibler et al. (2011), *PLoS ONE*, 6: e19509.

Нуклеаза с цинковыми пальцами для ингибирования HLA и/или TCR

«ZFN» или «нуклеаза с цинковыми пальцами» или «ZFN для HLA и/или TCR» или «ZFN для ингибирования HLA и/или TCR» относятся к нуклеазе с цинковыми пальцами - искусственной нуклеазе, которую можно использовать для редактирования гена HLA и/или TCR, и/или ингибирующей молекуле, описанной в настоящем описании (например, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, ГКГС класса I, ГКГС класса II, GAL9, аденозина и TGFR-бета).

Подобно TALEN, ZFN включает домен нуклеазы FokI (или его производное), слитый с ДНК-связывающим доменом. В случае ZFN ДНК-связывающий домен включает один или несколько цинковых пальцев. Carroll et al. (2011), *Genetics Society of America*, 188: 773-782; и Kim et al. (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 1156-1160.

Цинковый палец представляет собой небольшой мотив белковой структуры, стабилизированный одним или несколькими ионами цинка. Цинковый палец может включать, например, Cys2His2, и может узнавать последовательность в приблизительно 3 п.о. Различные цинковые пальцы известной специфичности можно объединить и получить полипептиды с несколькими пальцами, которые узнают последовательности в примерно 6, 9, 12, 15 или 18 п.о. Доступны различные методы селекции и модульной сборки для получения цинковых пальцев (и их комбинаций), узнающих специфические последовательности, включающие фаговый дисплей, дрожжевые одногибридные системы, бактериальные одногибридные и двугибридные системы и клетки млекопитающих.

Подобно TALEN, ZFN следует димеризовать для расщепления ДНК. Таким образом, требуется пара ZFN для нацеливания на сайты непалиндромной ДНК. Два отдельных ZFN должны связывать противоположные нити ДНК с их нуклеазами должным образом обособленно. Bitinaite et al. (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 10570-5.

Также подобно TALEN, ZFN может создавать двухнитевой разрыв в ДНК, который может создать мутацию сдвига рамки, если восстановлен ошибочно, что ведет к снижению экспрессии и количества HLA и/или TCR в клетке. ZFN также можно использовать с гомологичной рекомбинацией для мутирования в гене HLA или TCR.

ZFN, специфические для последовательностей в HLA или TCR, можно сконструировать с использованием любого способа, известного в технике. См., например, Provasi (2011), *Nature Med.*, 18: 807-815; Torikai (2013), *Blood*, 122: 1341-1349; Cathomen et al. (2008), *Mol. Ther.*, 16: 1200-7; Guo et al. (2010), *J. Mol. Biol.*, 400: 96; публикация патента США 2011/0158957; и публикация патента США 2012/0060230.

Экспрессия теломеразы

Без желания привязываться к какой-либо теории, в некоторых воплощениях терапевтическая Т-клетка имеет краткосрочное существование у пациента из-за укороченных теломер в Т-клетке; соответственно, трансфекция геном теломеразы может удлинить теломеры Т-клетки и улучшить продолжительность существования Т-клетки у пациента. См. Carl June, «Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic», *Journal of Clinical Investigation*, 117: 1466-1476 (2007). Так, в одном воплощении иммунная эффекторная клетка, например, Т-клетка, экспрессирует со смещением субъединицу теломеразы, например, каталитическую субъединицу теломеразы, например, TERT, например, hTERT. В некоторых аспектах такое раскрытие дает способ получения CAR-экспрессирующей клетки, включающий контактирование клетки с нуклеиновой кислотой, кодирующей субъединицу теломеразы, например, каталитическую субъединицу теломеразы, например, TERT, например, hTERT. Клетку можно ввести в контакт с нуклеиновой кислотой до, одновременно или после контактирования с конструкцией, кодирующей CAR.

В одном аспекте раскрытие показывает способ получения популяции иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток). В одном воплощении способ включает предоставление популяции иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток), контактирование популяции иммунных эффекторных клеток с нуклеиновой кислотой, кодирующей CAR, и контактирование популяции иммунных эффекторных клеток с нуклеиновой кислотой, кодирующей субъединицу теломеразы, например, hTERT, в условиях, которые допускают экспрессию CAR и теломеразы.

В одном воплощении нуклеиновая кислота, кодирующая субъединицу теломеразы, представляет собой ДНК. В одном воплощении нуклеиновая кислота, кодирующая субъединицу теломеразы, включает промотор, способный вести экспрессию субъединицы

теломеразы.

В одном воплощении hTERT представляет собой аминокислотную последовательность белка GenBank Protein ID AAC51724.1 (Meyerson et al., «hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells и during Immortalization»,

5 Cell, Volume 90, Issue 4, 22 August 1997, Pages 785-795), которая приводится далее:
 MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVRRLGPQGWRLVQRGDPAAFRALVAQCLV
 CVPWDARPPPAAPSFRQVVSCLKELVARVLQRLCERGAKNVLAFGFALLDGARGGPPEA
 FTTSVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGDDVLVHLLARCALFVLVAPSCAYQVCG
 PPLYQLGAATQARPPPHASGPRRRLGCERAWNHSVREAGVPLGLPAPGARRRGSASR
 10 SLPLPKRPRRGAAPEPERTPVGQGSWAHPGRTRGPSDRGFCVVSAPARPAEEATSLEGAL
 SGTRHSHPSVGRQHHAAGPPSTSRPPRPWDTPCPPVYAETKHFLYSSGDKEQLRPSFLLSS
 LRPSLTGARRIVETIFLGSRPWMPGTPRRLPRLPQRYWQMRPLFLELLGNHAQCPYGV
 LKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPQGSVAAPEEEDTDPRRLVQLLRQHSSPWQVYGFVR
 ACLRRLVPPGLWGSRHNERFLRNTKKFISLGKHAKLSLQELTWKMSVRGCAWLRRSP
 15 GVGCVPAAEHRLREEILAKFLHWLMSVYVVELLSFFYVTETTFQKNRLFFYRKSWS
 KLQSIGIRQHLKRVQLRELSEAIEVRQHREARPALTSRLRFIPKPDGLRPVNMMDYVVG
 RTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNAYERARRPGLLGASVLGLDDIHRWRTFVLRVRAQ
 DPPPELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIASIIKPQNTYCVRRYAVVQKAAHGHVRKAF
 KSHVSTLTDLQPYMRQFVAHLQETSPLRDAVVIEQSSSLNEASSGLFDVFLRFMCHHAV
 20 RIRGKSYVQCQGIQGSILSTLLCSLCYGD MENKLFAGIRRDGLLLRLVDDFLVTPHLT
 HAKTFLRTLVRGVPEYGCVVNLKTKVNVNFPVEDEALGGTAFVQMPAHGLFPWCGLLL
 DTRTLEVQSDYSSYARTSIRASLTFNRGFKAGRNMRKLFGLVRLKCHSLFLDLQVNSL
 QTVCTNIYKILLQAYRFHACVLQLPFHQVWKNPTFFLRVISDTASLCYSILKAKNAG
 MSLGAKGAAGPLPSEAVQWLCHQAFLKLTRHRVTYVPLLGSRLTAQTQLSRKLPGTT
 25 LTALAAANPALPSDFKTILD (SEQ ID NO: 214).

В одном воплощении hTERT имеет последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 214. В одном воплощении hTERT имеет последовательность SEQ ID NO: 214. В одном воплощении hTERT включает делецию (например, не более 5, 10, 15, 20 или 30 аминокислот) в N-конце, C-конце или

30 обоих концах. В одном воплощении hTERT включает трансгенную аминокислотную последовательность (например, из не более 5, 10, 15, 20 или 30 аминокислот) в N-конце, C-конце или обоих концах.

В одном воплощении hTERT кодирован нуклеотидной последовательностью GenBank, инвентарный № AF018167 (Meyerson et al., «hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic

35 Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells и during Immortalization», Cell, Volume 90, Issue 4, 22 August 1997, Pages 785-795):

1 caggcagcgt ggtcctgctg cgcacgtggg aagccctggc cccggccacc cccgcgatgc
 61 cgcgcgtcc ccgctgccga gccgtgcgct cctgctgctg cagccactac cgcgaggtgc
 121 tgccgctggc cacgttcgtg cggcgctgg ggccccaggg ctggcggtg gtgcagcg
 40 181 gggaccggc ggctttccgc gcgctggtgg ccagtgctt ggtgtgcgtg cctgggacg
 241 cacggccgcc ccccgccgcc cctccttcc gccaggtgtc ctgcctgaag gagctggtg
 301 cccgagtgtg gcagaggctg tgcgagcgcg gcgcgaagaa cgtgctggcc ttcggcttcg
 361 cgtgctgga cggggccgc gggggcccc cagagcctt caccaccagc gtgcgcagc
 421 acctgccccaa cacggtgacc gacgcactgc gggggagcgg ggcgtggggg ctgctgttcg
 45 481 gccgcgtggg cgacgacgtg ctggttacc tctggcacg ctgcgcgtc ttgtgctgg
 541 tggctcccag ctgcgcctac caggtgtgctg ggccgccgct gtaccagtc ggcgctgcca
 601 ctcaggcccg gccccgcca cagctagtg gacccgaag gcgtctggga tgcgaacggg
 661 cctggaacca tagcgtcagg gagggcggg tccccctggg cctgccagcc ccgggtgcga

721 ggaggcgcg gggcagtgcc agccgaagtc tgccgttgcc caagagggccc aggcgtggcg
 781 ctgccccctga gccggagcgg acgcccggtg ggcagggggtc ctgggcccac ccgggcagga
 841 cgcgtggacc gactgaccgt gggttctgtg tgggtgcacc tgccagacct gccgaagaag
 901 ccacctcttt ggagggtgcg ctctctggca cgcgccactc ccacctatcc gtgggcccgc
 5 961 agcaccacgc ggcccccca tccacatcgc ggccaccacg tcctggggac acgccttctc
 1021 ccccggtgta cgcgagacc aagcaactcc tctactctc aggcgacaag gacgagctgc
 1081 ggccctctct cctactcagc tctctgaggc ccagcctgac tggcgctcgg aggtcgtgg
 1141 agaccatctt tctgggttcc aggccttggg tgccagggac tccccgcagg ttccccgcc
 1201 tgccccagcg ctactggcaa atgcggcccc tgttcttggg gctgcttggg aaccacgcgc
 10 1261 agtgccecta cggggtgctc ctcaagacgc actgcccgtc gcgagctgcg gtcaccccag
 1321 cagccggtgt ctgtgcccgg gagaagcccc agggctctgt ggcgggcccc gaggaggagg
 1381 acacagacct ccgtcgctg gtgcagctgc tccgccagca cagcagcccc tggcaggtgt
 1441 acggcttctg gcgggcctgc ctgcgccggc tggtgcccc aggcctctgg ggctccaggc
 1501 acaacgaacg ccgttctc aggaacacca agaagttcat ctccctgggg aagcatgcca
 15 1561 agctctcgtc gcaggagctg acgtggaaga tgagcgtgcg gggctgcgtc ttgctgcgca
 1621 ggagcccagg ggttggtgt gttccggccg cagagcaccg tctgcgtgag gagatctgg
 1681 ccaagtctct gactggctg atgagtgtgt acgtcgtcga gctgctcagg tctttcttt
 1741 atgtcacgga gaccacgtt caaaagaaca ggctctttt ctaccggaag agtgtctgga
 1801 gcaagttgca aagcattgga atcagacagc actgaagag ggtgcagctg cgggagctgt
 20 1861 cggaagcaga ggtcaggcag catcggggaag ccagggccgc cctgctgacg tccagactcc
 1921 gttcatccc caagcctgac gggctgcggc cgattgtgaa catggactac gtcgtgggag
 1981 ccagaacgtt ccgagagaa aagagggccg agcgtctcac ctgaggggtg aagcactgt
 2041 tcagcgtgct caactacgag cgggcgcggc gccccggcct cctgggcgcc tctgtctgg
 2101 gcctggacga tatccacagg gcctggcgca cttctgtgt gctgtgcgg gcccaggacc
 25 2161 cgccgctga gctgtacttt gtcaaggtgg atgtacggg cgcgtacgac accatcccc
 2221 aggacaggct caggaggtc atcgccagca tcatcaaacc ccagaacacg tactcgtgc
 2281 gtcggtatgc cgtggtccag aaggccgcc atgggcacgt ccgcaaggcc ttcaagagcc
 2341 acgtctctac ctgacagac ctccagccgt acatgcgaca gttcgtggct cacctgcagg
 2401 agaccagccc gctgagggat gccgtcgtca tcgagcagag ctctccctg aatgaggcca
 30 2461 gcagtggcct ctgacgctc ttctacgtc tcatgtgcca ccagccgtg cgcacaggg
 2521 gcaagtccta cgtccagtgc caggggatcc cgcagggctc catctctcc acgtgctct
 2581 gcagcctgtg ctacggcgac atggagaaca agctgtttgc ggggattcgg cgggacgggc
 2641 tgetctcgcg ttggtggat gatttctgt tggtagacc tcacctacc cacgcgaaa
 2701 cttctctcag gacctggtc cgaggtgtcc ctgagtatgg ctgcgtggtg aactgcgga
 35 2761 agacagtggg gaacttcct gtagaagacg aggccttggg tggcacggct ttgttcaga
 2821 tgccggccca cggcctatc cctggtgcg gcctgctgct ggatacccg accctggagg
 2881 tgacagcgca ctactccagc tatgcccgga cctccatcag agccagtctc acctcaacc
 2941 gcggcttcaa ggctgggagg aacatgcgtc gcaaactctt tggggtcttg cggctgaagt
 3001 gtcacagcct gttctggat ttgcaggtga acagcctcca gacggtgtgc accaactct
 40 3061 acaagatcct cctgctgcag gcgtacaggt ttcacgatg tgtgctgcag ctccatttc
 3121 atcagcaagt ttggaagaac ccacatttt tctgcgcgt catctctgac aggcctccc
 3181 tctgtactc catctgaaa gccagaacg cagggatgtc gctgggggcc aaggcgccg
 3241 ccggccctct gccctccgag gccgtgcagt ggctgtgcca ccaagcttc ctgctcaagc
 3301 tgactcgaca ccgtgtcacc tacgtgccac tctggggtc actcaggaca gccagacgc
 45 3361 agctgagtcg gaagctccc ggagacacgc tgactgccct ggaggccgca gccaacccg
 3421 cactgcctc agactcaag accatctgg actgatggcc acccgccac agccaggccg
 3481 agagcagaca ccagcagccc tgcacggc ggctctacgt ccagggagg gagggcgccg
 3541 ccacaccag gcccgaccg ctgggagtct gaggcctgag tgagtgttg gccgaggcct

3601 gcatgtccgg ctgaaggctg agtgtccggc tgaggcctga gcgagtgtcc agccaagggc
 3661 tgagtgtcca gcacacctgc cgtcttcaact tccccacagg ctggcgctcg gctccacccc
 3721 agggccagct ttctctcacc aggagcccgg ctccactcc ccacatagga atagtccatc
 3781 cccagattcg ccattgttca cccctcgccc tgcctcctt tgccttccac ccccaccatc
 5 3841 caggtggaga ccctgagaag gaccctggga gctctgggaa ttggagtga ccaaaggtgt
 3901 gccctgtaca caggcgagga ccctgcacct ggatgggggt ccctgtgggt caaattgggg
 3961 ggaggtgctg tgggagtaaa atactgaata tatgagtttt tcagttttga aaaaaaaaaa
 4021 aaaaaaa (SEQ ID NO: 215).

В одном воплощении hTERT кодирован нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности SEQ ID NO: 215. В одном воплощении hTERT кодирован нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 215.

Активация и экспансия Т-клеток

Как правило, Т-клетки можно активировать и размножить с использованием способов, описанных, например, в патентах США 6352694, 6534055, 6905680, 6692964, 5858358, 6887466, 6905681, 7144575, 7067318, 7172869, 7232566, 7175843, 5883223, 6905874, 6797514, 6867041 и публикации заявки на патент США № 20060121005.

Как правило, Т-клетки по изобретению можно размножить путем контактирования с поверхностью, имеющий присоединенный к ней агент, который стимулирует сигнал, ассоциированный с комплексом CD3/TCR, и лиганд, который стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности Т-клеток. В частности, популяции Т-клеток можно стимулировать так, как описано в настоящем описании, например, путем контакта с анти-CD3 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, или анти-CD2 антителом, иммобилизованным на поверхности, или путем контакта с активатором протеинкиназы С (например, бриостатином) в конъюгации с ионофором кальция. Для костимуляции вспомогательной молекулы на поверхности Т-клеток используют лиганд, который связывает вспомогательную молекулу. Например, популяцию Т-клеток можно ввести в контакт с анти-CD3 антителом и анти-CD28 антителом в условиях, соответствующих стимуляции пролиферации Т-клеток. Для того, чтобы стимулировать пролиферацию или CD4+ Т-клеток или CD8+ Т-клеток, можно использовать анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело. Примеры анти-CD28 антитела включают 9.3, В-Т3, XR-CD28 (Diaclone, Besançon, France), которые можно использовать как и другие способы, обычно известные в технике (Berg et al., Transplant Proc., 30(8): 3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med., 190(9): 1319-1328, 1999; Garland et al., J. Immunol Meth., 227(1-2): 53-63, 1999).

В некоторых аспектах первичный стимулирующий сигнал и костимулирующий сигнал для Т-клетки могут быть обеспечены различными протоколами. Например, агенты, предоставляющие каждый сигнал, могут находиться в растворе или соединены на поверхности. При соединении на поверхности агенты могут соединяться с одной и той же поверхностью (т.е., в «цис» формации) или с отдельными поверхностями (т.е., в «транс» формации). С другой стороны, один агент может быть соединен с поверхностью, а другой агент может находиться в растворе. В одном аспекте агент, обеспечивающий костимулирующий сигнал, связан с поверхностью клетки, и агент, обеспечивающий первичный сигнал активации, находится в растворе или соединен с поверхностью. В некоторых аспектах оба агента могут находиться в растворе. В одном аспекте агенты могут находиться в растворимой форме и затем сшиты с поверхностью, такие как клеточные экспрессирующие Fc-рецепторы или антитело или другой связывающий агент, который будет связываться с агентами. В этом отношении см., например,

публикации заявок на патент США №№ 20040101519 и 20060034810 для искусственных антигенпрезентирующих клеток (аAPC), которые в настоящем изобретении рассматриваются для применения при активации и экспансии Т-клеток.

В одном аспекте два агента иммобилизованы на гранулах: или на одной грануле, т.е., «цис», или на отдельных гранулах, т.е., «транс». Например, агент, обеспечивающий первичный сигнал активации, представляет собой анти-CD3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и агент, обеспечивающий костимулирующий сигнал, представляет собой анти-CD28 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; и оба агента соиммобилизованы на одной и той же грануле в эквивалентных молекулярных количествах. В одном аспекте используют отношение 1:1 каждого антитела, связанного с гранулами, для экспансии CD4⁺ Т-клеток и роста Т-клеток. В некоторых аспектах настоящего изобретения используют такое отношение анти-CD3:CD28 антител, связанных с гранулами, что наблюдают повышение экспансии Т-клеток по сравнению с экспансией, наблюдаемой с использованием отношения 1:1. В одном частном аспекте наблюдают повышение от примерно 1 до примерно 3 раз по сравнению с экспансией, наблюдаемой с использованием отношения 1:1. В одном аспекте отношение анти-CD3:CD28 антител, связанных с гранулами, колеблется от 100:1 до 1:100 со всеми целыми величинами в промежутке. В одном аспекте настоящего изобретения с частицами связано больше анти-CD28 антител, чем анти-CD3 антител, т.е., отношение CD3:CD28 меньше единицы. В некоторых аспектах изобретения отношение анти-CD28 антител к анти-CD3 антителам, связанным с гранулами, превышает 2:1. В одном частном аспекте используют отношение CD3:CD28 антител, связанных с гранулами, 1:100. В одном аспекте используют отношение CD3:CD28 антител, связанных с гранулами, 1:75. В другом аспекте используют отношение CD3:CD28 антител, связанных с гранулами, 1:50. В одном аспекте используют отношение CD3:CD28 антител, связанных с гранулами, 1:30. В одном предпочтительном аспекте используют отношение CD3:CD28 антител, связанных с гранулами, 1:10. В одном аспекте используют отношение CD3:CD28 антител, связанных с гранулами, 1:3. В еще одном аспекте используют отношение CD3:CD28 антител, связанных с гранулами, 3:1.

Отношения частиц к клеткам от 1:500 до 500:1 и любые целые величины в промежутке могут использоваться для стимуляции Т-клеток или других клеток-мишеней. Как могут легко признать специалисты в данной области техники, отношение частиц к клеткам может зависеть от размера частиц относительно клетки-мишени. Например, гранулы небольшого размера могут связывать только несколько клеток, в то время как более крупные гранулы могут связывать много клеток. В некоторых аспектах отношение клеток к частицам колеблется от 1:100 до 100:1 и любой целой величины в промежутке, и в других аспектах отношение включает значения 1:9-9:1 и любые целые величины в промежутке, которые также могут использоваться для стимуляции Т-клеток. Отношение анти-CD3- и анти-CD28-соединенных частиц к Т-клеткам, которое приводит к стимуляции Т-клеток, может изменяться, как отмечалось выше, однако некоторые предпочтительные значения включают 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 и 15:1, причем одно предпочтительное отношение составляет по меньшей мере 1:1 на Т-клетку. В одном аспекте используют отношение частиц к клеткам 1:1 или меньше. В одном отдельном аспекте предпочтительное отношение частицы:клетки составляет 1:5. В других аспектах отношение частиц к клеткам может изменяться в зависимости от дня стимуляции. Например, в одном аспекте отношение частиц к клеткам составляет от 1:1 до 10:1 в первый день, и затем к клеткам добавляют дополнительные частицы каждый день или через день в течение до 10 дней

до конечных отношений от 1:1 до 1:10 (на основании числа клеток в день добавления). В одном отдельном аспекте отношение частиц к клеткам составляет 1:1 в первый день стимуляции и доводится до 1:5 к третьему и пятому дню стимуляции. В одном аспекте частицы добавляют ежедневно или через день, основываясь на конечном отношении 1:1 в первый день и 1:5 на третий и пятый дни стимуляции. В одном аспекте отношение частиц к клеткам составляет 2:1 в первый день стимуляции и доводится до 1:10 на третий и пятый дни стимуляции. В одном аспекте частицы добавляют ежедневно или через день, основываясь на конечном отношении 1:1 в первый день и 1:10 на третий и пятый дни стимуляции. Специалисты в данной области техники признают, что множество других отношений могут подходить для применения в настоящем изобретении. В частности, отношения будут изменяться в зависимости от размера частиц и размера и типа клеток. В одном аспекте наиболее типичные отношения для использования составляют приблизительно 1:1, 2:1 и 3:1 в первый день.

В других аспектах настоящего изобретения клетки, такие как Т-клетки, комбинируют с гранулами с нанесенным агентом, затем гранулы и клетки разделяют, и затем клетки культивируют. В другом аспекте перед культивированием гранулы с нанесенным агентом и клетки не разделяют, а культивируют вместе. В другом аспекте гранулы и клетки сначала концентрируют путем применения силы, такой как магнитная сила, что приводит к повышенному лигированию маркеров клеточной поверхности, посредством чего вызывается стимуляция клеток.

Как пример, белки клеточной поверхности можно лигировать, допуская парамагнитные гранулы, к которым присоединены анти-CD3 и анти-CD28 (3×28 гранул), к контакту с Т-клетками. В одном аспекте клетки (например, 10^4 - 10^9 Т-клеток) и гранулы (например, DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 Т парамагнитные гранулы в отношении 1:1) объединяют в буфере, например, PBS (без двухвалентных катионов, таких как катионы кальция и магния). Снова специалисты в данной области техники легко поймут, что можно использовать любую концентрацию клеток. Например, клетка-мишень может быть очень редкой в образце и составлять только 0,01% в образце, или образец полностью может включать клетку-мишень, представляющую интерес (т.е., 100%). Соответственно, любое число клеток находится в контексте настоящего изобретения. В некоторых аспектах может быть желательно существенное уменьшение объема, в котором частицы и клетки смешивают вместе (т.е., повышение концентрации клеток), для гарантии максимального контакта клеток и частиц. Например, в одном аспекте используют концентрацию клеток примерно 10 миллиардов клеток/мл, 9 миллиардов/мл, 8 миллиардов/мл, 7 миллиардов/мл, 6 миллиардов/мл, 5 миллиардов/мл или 2 миллиарда клеток/мл. В одном аспекте используют концентрацию клеток свыше 100 миллионов клеток/мл. В другом аспекте используют концентрацию клеток 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 миллионов клеток/мл. В еще одном аспекте используют концентрацию клеток 75, 80, 85, 90, 95 или 100 миллионов клеток/мл. В других аспектах можно использовать концентрации 125 или 150 миллионов клеток/мл. Использование высоких концентраций может привести к повышенному выходу клеток, активации клеток и экспансии клеток. Дополнительно использование высоких концентраций дает возможность более эффективного захвата клеток, которые могут слабо экспрессировать антигены-мишени, представляющие интерес, таких как CD28-отрицательные Т-клетки. Такие популяции клеток могут иметь терапевтическую ценность и могут быть желательны для получения в некоторых аспектах. Например, использование высоких концентраций дает возможность более эффективной селекции CD28+ Т-клеток, которые обычно имеют более слабую экспрессию CD28.

В одном воплощении клетки, трансдуцированные нуклеиновой кислотой, кодирующей CAR, например, CAR, описанный в настоящем описании, размножают, например, способом, описанным в настоящем описании. В одном воплощении клетки размножают в культуре в течение периода от нескольких часов (например, примерно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 18, 21 час) до примерно 14 дней (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 дней). В одном воплощении клетки размножают в течение периода 4-9 дней. В одном воплощении клетки размножают в течение периода 8 дней или меньше, например, 7, 6 или 5 дней. В одном воплощении клетки, например, CLL-1-CAR клетки, описанные в настоящем описании, размножают в культуре в течение 5 дней, и полученные клетки являются более эффективными, чем такие же клетки, выращенные в культуре в течение 9 дней в тех же условиях культивирования. Эффективность можно определить, например, по различным функциям Т-клеток, например, пролиферации, киллинге клеток-мишеней, продуцированию цитокинов, активации, миграции или их комбинациям. В одном воплощении клетки, например, CLL-1-CAR клетки, описанные в настоящем описании, размноженные в течение 5 дней, показывают по меньшей мере одно-, дву-, трех- или четырехкратное повышение удвоения клеток после антигенной стимуляции по сравнению с такими же клетками, выращенными в культуре в течение 9 дней в тех же условиях культивирования. В одном воплощении клетки, например, CLL-1-CAR клетки, описанные в настоящем описании, размножают в культуре в течение 5 дней, и полученные клетки показывают более высокое продуцирование провоспалительных цитокинов, например, уровней IFN- γ и/или GM-CSF, по сравнению с такими же клетками, выращенными в культуре в течение 9 дней в тех же условиях культивирования. В одном воплощении клетки, например, CLL-1-CAR клетки, описанные в настоящем описании, размноженные в течение 5 дней, показывают по меньшей мере одно-, дву-, трех-, четырех-, пяти-, десятикратное или большее повышение, в пг/мл, продуцирования провоспалительных цитокинов, например, уровней IFN- γ и/или GM-CSF, по сравнению с такими же клетками, выращенными в культуре в течение 9 дней в тех же условиях культивирования.

В одном аспекте настоящего изобретения смесь можно культивировать в течение от нескольких часов (например, 3 часов) до примерно 14 дней или любой целой величины в промежутке. В одном аспекте смесь можно культивировать в течение 21 дня. В одном аспекте изобретения гранулы и Т-клетки культивируют вместе в течение примерно восьми дней. В одном аспекте изобретения гранулы и Т-клетки культивируют вместе в течение примерно 2-3 дней. Также могут быть желательны несколько циклов стимуляции, так что время культивирования Т-клеток может составлять 60 дней или более. Условия, соответствующие культивированию Т-клеток, включают соответствующие среды (например, минимальные поддерживающие среды или среды RPMI 1640 или X-vivo 15, (Lonza)), которые могут содержать факторы, необходимые для пролиферации и жизнестойкости, включая сыворотку (например, плазму коровы или человеческую сыворотку), интерлейкин-2 (IL-2), инсулин, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF- β , и TNF- α или любые другие добавки для роста клеток, известные специалистам в данной области техники. Другие добавки для роста клеток включают, но не ограничиваясь перечисленным, поверхностно-активные вещества, плазматин и восстановители, такие как N-ацетилцистеин и 2-меркаптоэтанол. Среда может включать RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15, и X-Vivo 20, Optimizer, с добавлением аминокислот, пирувата натрия и витаминов, или бессывороточные или с добавлением соответствующего количества сыворотки (или плазмы) или определенного набора гормонов, и/или некоего количества цитокина(ов), достаточного для роста и

экспансии Т-клеток. Антибиотики, например, пенициллин и стрептомицин, включают только в экспериментальные культуры, но не в культуры, которые должны вводиться субъекту. Клетки-мишени поддерживаются в условиях, необходимых для поддержания роста, например, соответствующей температуре (например, 37°C) и атмосфере (например, с добавлением 5% CO₂).

В одном воплощении клетки размножают в соответствующих средах (например, средах, описанных в настоящем описании), которые включают один или несколько интерлейкинов, что приводит к по меньшей мере 200-кратному (например, 200-кратному, 250-кратному, 300-кратному, 350-кратному) увеличению числа клеток за 14-дневный период экспансии, например, при измерении способом, описанным в настоящем описании, таким как проточная цитометрия. В одном воплощении клетки размножают в присутствии IL-15 и/или IL-7 (например, IL-15 и IL-7).

В воплощениях способы, описанные в настоящем описании, например, способы получения CAR-экспрессирующих клеток, включают удаление регуляторных Т-клеток, например, CD25+ Т-клеток, из клеточной популяции, например, с использованием анти-CD25 антитела или его фрагментов, или CD25-связывающего лиганда IL-2. Способы удаления регуляторных Т-клеток, например, CD25+ Т-клеток, из клеточной популяции описаны в настоящем описании. В воплощениях способы, например, способы получения, дополнительно включают контактирование клеточной популяции (например, популяции, в которой регуляторные Т-клетки, такие как CD25+ Т-клетки, истощены; или клеточной популяции, которая предварительно контактировала с анти-CD25 антителом, его фрагментом или CD25-связывающим лигандом) с IL-15 и/или IL-7. Например, клеточную популяцию (например, которая предварительно контактировала с анти-CD25 антителом, его фрагментом или CD25-связывающим лигандом) размножают в присутствии IL-15 и/или IL-7.

В некоторых воплощениях CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят в контакт с композицией, включающей полипептид интерлейкин-15 (IL-15), полипептид рецептор альфа интерлейкина-15 (IL-15Ra) или комбинацией как полипептида IL-15, так и полипептида IL-15Ra, например, hetIL-15, во время получения CAR-экспрессирующей клетки, например, *ex vivo*. В воплощениях CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят в контакт с композицией, включающей полипептид IL-15, во время получения CAR-экспрессирующей клетки, например, *ex vivo*. В воплощениях CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят в контакт с композицией, включающей комбинацию как полипептида IL-15, так и полипептида IL-15Ra, во время получения CAR-экспрессирующей клетки, например, *ex vivo*. В воплощениях CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят в контакт с композицией, включающей полипептид hetIL-15, во время получения CAR-экспрессирующей клетки, например, *ex vivo*.

В одном воплощении CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят в контакт с композицией, включающей полипептид hetIL-15, во время экспансии *ex vivo*. В одном воплощении CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят в контакт с композицией, включающей полипептид IL-15, во время экспансии *ex vivo*. В одном воплощении CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят в контакт с композицией, включающей как полипептид IL-15, так и полипептида IL-15Ra, во время экспансии *ex vivo*. В одном воплощении контактирование приводит к выживанию и пролиферации субпопуляции лимфоцитов, например, CD8+ Т-клеток.

Подвергавшиеся стимуляции в течение различного времени Т-клетки могут

показывать различные свойства. Например, типичные образцы крови или аферезные продукты мононуклеарных клеток периферической крови имеют популяцию хелперных Т-клеток (ТН, CD4+), которая больше популяции цитотоксических или супрессорных Т-клеток (ТС, CD8+). Экспансия Т-клеток *ex vivo* путем стимуляции рецепторов CD3 и CD28 продуцирует популяцию Т-клеток, которая априорно до примерно дней 8-9 состоит преимущественно из ТН-клеток, в то время как после примерно дня 8-9 популяция Т-клеток включает значительно большую популяцию ТС-клеток. Соответственно, в зависимости от цели лечения может быть выгодна инфузия субъекту Т-клеточной популяции, включающей преимущественно ТН-клетки. Подобным образом, если выделено антигенспецифическое подмножество ТС-клеток, может быть благоприятным размножение этого подмножества до более высокой степени.

Далее, кроме маркеров CD4 и CD8 существенно изменяются другие фенотипические маркеры, но по большей части, воспроизводимо в ходе процесса экспансии клеток. Таким образом, такая воспроизводимость дает возможность получать продукт активированные Т-клетки для конкретных целей.

Как только CLL-1-CAR сконструирована, можно использовать различные анализы для оценки активности молекулы, такой как, но без ограничения, способность размножать Т-клетки после антигенной стимуляции, продолжать экспансию Т-клеток в отсутствие рестимуляции и противораковая активность на соответствующих животных моделях *in vitro*. Анализы для оценки действий CLL-1-CAR описаны более подробно ниже.

Анализ методом вестерн-блоттинга экспрессии CAR в первичных Т-клетках можно использовать для обнаружения присутствия мономеров и димеров. См., например, Milone *et al.*, Molecular Therapy, 17(8): 1453-1464 (2009). Очень коротко, Т-клетки (смесь 1:1 CD4+ и CD8+ Т-клеток), экспрессирующие CAR, размножают *in vitro* в течение более 10 дней с последующим лизисом и SDS-PAGE в условиях восстановления. Содержащий CAR полноразмерный цитоплазматический домен TCR- ζ и цепь эндогенного TCR- ζ обнаруживают вестерн-блоттингом с использованием антитела к цепи TCR- ζ . Те же подмножества Т-клеток используют для анализа SDS-PAGE в условиях без восстановления для возможности оценки образования ковалентных димеров.

Экспансию CAR⁺ Т-клеток *in vitro* после антигенной стимуляции можно измерить проточной цитометрией. Например, смесь CD4⁺ и CD28⁺ Т-клеток стимулируют α CD3/ α CD28 аАРС с последующей трансдукцией лентивирусными векторами, экспрессирующими GFP под контролем анализируемых промоторов. Примеры промоторов включают ген CMV IE, EF-1 α , убиквитин С или фосфоглицерокиназные (PGK) промоторы. Флуоресценцию GFP оценивают проточной цитометрией в день 6 культивирования в подмножествах CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клеток. См., например, Milone *et al.*, Molecular Therapy, 17(8): 1453-1464 (2009). С другой стороны, смесь CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток стимулируют покрытыми α CD3/ α CD28 магнитными гранулами в день 0, и трансдуцируют CAR в день 1 с использованием бицистронного лентивирусного вектора, экспрессирующего CAR вместе с eGFP, с использованием последовательности 2A рибосомного перепрыгивания. Культуры можно повторно стимулировать CLL-1-экспрессирующими клетками.

Также можно оценить длительную экспансию CAR⁺ Т-клеток в отсутствие повторной стимуляции. См., например, Milone *et al.*, Molecular Therapy, 17(8): 1453-1464 (2009). Коротко, средний объем Т-клеток (f1) измеряют в день 8 культивирования с использованием счетчика частиц Coulter Multisizer III, Nexcelom Cellometer Vision или

Millipore Scepter, после стимуляции покрытыми α CD3/ α CD28 магнитными гранулами в день 0 и трансдукции указанным CAR в день 1.

Также можно использовать животные модели для измерения активности CART. Например, можно использовать модель с ксенотрансплантатом с использованием

5 человеческих CLL-1-специфических CAR⁺ Т-клеток для лечения первичного AML человека у иммунодефицитных мышей. Очень коротко, после установления опухолей мышей рандомизируют по группам лечения. CLL-1-CART клетки инъецируют иммунодефицитным мышам, например, внутривенно. Животных оценивают на раковые клетки с недельными интервалами. Число CLL-1-экспрессирующих клеток AML
10 периферической крови измеряют у мышей, которым инъецировали CLL-1-CART клетки или mock-трансдуцированные Т-клетки. Кривые выживания для групп сравнивают с использованием log рангового критерия.

Цитотоксичность можно оценить стандартным анализом на высвобождение ⁵¹Cr. См., например, Milone *et al.*, Molecular Therapy, 17(8): 1453-1464 (2009). Коротко, клетки-мишени нагружают ⁵¹Cr (в виде NaCrO₄, New England Nuclear, Boston, MA) при 37°C в течение 2 часов при быстром перемешивании, дважды промывают полной RPMI и высевают в титрационные микропалншеты. Эффекторные Т-клетки смешивают с клетками-мишенями в лунках в полной RPMI при различных отношениях эффекторная клетка:клетка-мишень (Е:Т). Также готовят дополнительные лунки, содержащие только среды (спонтанное высвобождение, SR) или 1% раствор детергента тритона-Х 100 (общее высвобождение, TR). После 4-часовой инкубации при 37°C собирают супернатант из каждой лунки. Затем измеряют высвобожденный ⁵¹Cr с использованием счетчика гамма-частиц (Packard Instrument Co., Waltham, MA). Каждое условие выполняют по меньшей мере трижды, и процент лизиса вычисляют с использованием формулы % лизиса=(ER-SR)/(TR-SR), где ER представляет среднее высвобожденного ⁵¹Cr для
20 каждого условия эксперимента.

Технологию визуализации изображений можно использовать для оценки специфического сосредоточения и пролиферации CAR на животных моделях с опухолями. Такие анализы описаны, например, в Barrett *et al.*, Human Gene Therapy, 22: 1575-1586
30 (2011). Коротко, мышам NOD/SCID/ γ c^{-/-} (NSG) инъецируют IV клетки Nalm-6, и через 7 дней Т-клетки через 4 часа после электропорации конструкций CAR. Т-Клетки устойчиво трансфицируют лентивирусной конструкцией для экспрессии люциферазы светляка, и мышей визуализируют в случае биолюминесценции. С другой стороны, терапевтическую
35 эффективность и специфичность одной инъекции CAR⁺ Т-клеток на модели с ксенотрансплантатом Nalm-6 можно измерить следующим образом: мышам NSG инъецируют Nalm-6, трансдуцированные для устойчивой экспрессии люциферазы светляка, с последующей одной инъекцией Т-клеток, электропорированных CLL-1-CAR, через 7 дней. Животных визуализируют в различные моменты времени после инъекции.
40 Например, можно получить карты плотности тепловых фотонов с люциферазой светляка при лейкозе у представленных мышей в день 5 (за 2 дня до лечения) и день 8 (24 часа после CAR⁺ PBL).

Другие анализы, включая анализы, описанные в настоящем описании в разделе «Примеры», а также анализы, известные в технике, также можно использовать для
45 оценки конструкций CLL-1-CAR по изобретению.

С другой стороны или в комбинации со способами, описанными в настоящем описании, раскрываются одна или больше позиций из следующих: детекция и/или количественное определение CAR-экспрессирующих клеток (например, *in vitro* или *in*

vivo (например, клинический мониторинг)); экспансия и/или активация иммунных клеток и/или CAR-специфическая селекция, которые включают применение лиганда CAR. В одном примере воплощения лиганд CAR представляет собой антитело, которое связывается с молекулой CAR, например, связывается с антигенсвязывающим доменом CAR (например, антителом, которое связывается с антигенсвязывающим доменом, например, антиидотипическое антитело; или антитело, которое связывается с константным участком внеклеточного связывающего домена). В других воплощениях лиганд CAR представляет собой молекулу антигена CAR (например, молекулу антигена CAR, описанную в настоящем описании).

В одном аспекте раскрывается способ детекции и/или количественного определения CAR-экспрессирующих клеток. Например, можно использовать лиганд CAR для детекции и/или количественного определения CAR-экспрессирующих клеток *in vitro* или *in vivo* (например, клинический мониторинг CAR-экспрессирующих клеток у пациента или дозируемых пациенту). Способ включает

предоставление лиганда CAR (необязательно, меченного лиганда CAR, например, лиганда CAR, который включает метку, гранулу, радиоактивную или флуоресцентную метку);

приобретение CAR-экспрессирующей клетки (например, приобретение образца, содержащего CAR-экспрессирующие клетки, такого как изготовленный образец или клинический образец);

контактирование CAR-экспрессирующей клетки с лигандом CAR в условиях, в которых происходит связывание, посредством чего детектируется уровень (например, количество) присутствующих CAR-экспрессирующих клеток. Связывание CAR-экспрессирующей клетки с лигандом CAR можно обнаружить с использованием стандартных методов, таких как FACS, ELISA и т.п.

В другом аспекте раскрывается способ экспансии и/или активации клеток (например, иммунных эффекторных клеток). Способ включает

предоставление CAR-экспрессирующей клетки (например, первой CAR-экспрессирующей клетки или временно экспрессирующей CAR клетки);

контактирование указанной CAR-экспрессирующей клетки с лигандом CAR, например, лигандом CAR, описанным в настоящем описании, в условиях, в которых происходит экспансия и/или пролиферация иммунных клеток, посредством чего производится популяция активированных и/или размноженных клеток.

В некоторых воплощениях лиганд CAR находится сверху (например, иммобилизован или присоединен к субстрату, например, субстрату, не встречающемуся в природе). В некоторых воплощениях субстрат представляет собой неклеточный субстрат.

Неклеточный субстрат может представлять собой твердый носитель, выбранный из, например, планшета (титрационного микропланшета), мембраны (например, нитроцеллюлозной мембраны), матрицы, чипа или гранулы. В воплощениях лиганд CAR присутствует в субстрате (например, на поверхности субстрата). Лиганд CAR может быть иммобилизован, присоединен или связан ковалентно или нековалентно (например, сшит) с субстратом. В одном воплощении лиганд CAR присоединен (например, ковалентно присоединен) к грануле. В вышеуказанных воплощениях популяцию иммунных клеток можно размножить *in vitro* или *ex vivo*. Способ также может включать культивирование популяции иммунных клеток в присутствии лиганда молекулы CAR, например, с использованием любого из способов, описанных в настоящем описании.

В других воплощениях способ экспансии и/или активации клеток дополнительно

включает добавление второй стимулирующей молекулы, например, CD28. Например, лиганд CAR и вторую стимулирующую молекулу можно иммобилизовать на субстрате, например, одной или нескольких гранулах, посредством чего получают повышенную экспансию и/или активацию клеток.

- 5 В еще одном аспекте предлагается способ селекции или обогащения в отношении CAR-экспрессирующей клетки. Способ включает контактирование CAR-экспрессирующей клетки с лигандом CAR, как описано в настоящем описании; и селекцию клетки на основе связывания лиганда CAR.

- 10 В еще других воплощениях предлагается способ истощения, уменьшения и/или киллинга CAR-экспрессирующей клетки. Способ включает контактирование CAR-экспрессирующей клетки с лигандом CAR, как описано в настоящем описании; и таргетинг клетки на основе связывания лиганда CAR, посредством чего уменьшается число CAR-экспрессирующих клеток и/или происходит киллинг CAR-экспрессирующей клетки. В одном воплощении лиганд CAR соединяют с токсичным агентом (например, 15 токсином или клеточно-аблативным лекарственным средством). В другом воплощении антиидиотипическое антитело может вызвать активность эффекторной клетки, например, активность ADCC или ADC.

- Примеры анти-CAR антител, которые можно использовать в способах, описанных в настоящем описании, описаны, например, в WO 2014/190273 и в Jena et al., «Chimeric 20 Antigen Receptor (CAR)-Specific Monoclonal Antibody to Detect CD19-Specific T cells in Clinical Trials», PLOS, March, 2013, 8: 3 e57838, включенных в настоящее описание в качестве ссылок. В одном воплощении молекула антиидиотипического антитела узнает молекулу анти-CD19 антитела, например, анти-CD19 scFv. Например, молекула антиидиотипического антитела может конкурировать за связывание с CD19- 25 специфическим клоном CAR mAb № 136.20.1, описанным в Jena et al., PLOS, March 2013, 8: 3 e57838; может иметь такие же CDR (например, один или больше, например, все, VH CDR1, VH CDR2, CH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3, используя определение по Кабату, определение по Чотиа или комбинацию определений по Кабату и Чотиа), как CD19-специфический клон CAR mAb № 136.20.1; может иметь один или больше 30 (например, 2) переменных участка как CD19-специфический клон CAR mAb № 136.20.1, или может включать CD19-специфический клон CAR mAb № 136.20.1. В некоторых воплощениях антиидиотипическое антитело получают согласно способу, описанному Jena et al. В другом воплощении молекула антиидиотипического антитела представляет собой молекулу антиидиотипического антитела, описанную в WO 2014/190273. В 35 некоторых воплощениях молекула антиидиотипического антитела имеет такие же CDR (например, один или больше, например, все, VH CDR1, VH CDR2, CH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3), как молекула антитела в WO 2014/190273, такая как 136.20.1; может иметь один или больше (например, 2) переменных участка молекулы антитела в WO 2014/190273, или может включать CD19- молекулу антитела в WO 2014/190273, 40 такую как 136.20.1. В других воплощениях анти-CAR антитело связывается с константным участком внеклеточного связывающего домена молекулы CAR, например, как описано в WO 2014/190273. В некоторых воплощениях анти-CAR антитело связывается с константным участком внеклеточного связывающего домена молекулы CAR, например, константным участком тяжелой цепи (например, шарнирным участком 45 CH2-CH3) или константным участком легкой цепи. Например, в некоторых воплощениях анти-CAR антитело конкурирует за связывание с моноклональным антителом 2D3, описанным в WO 2014/190273, имеет такие же CDR (например, один или больше, например, все, VH CDR1, VH CDR2, CH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3), как 2D3,

или имеет один или больше (например, 2) вариабельных участка 2D3, или включает 2D3, как описано в WO 2014/190273.

В некоторых аспектах и воплощениях композиции и способы по настоящему изобретению оптимизированы для специфического подмножества Т-клеток, например, как описано в US, регистрационный № 62/031699, поданной 31 июля 2014, полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки. В некоторых воплощениях оптимизированные подмножества Т-клеток отображают повышенную продолжительность существования по сравнению с контрольной Т-клеткой, например, Т-клеткой другого типа (например, CD8⁺ или CD4⁺), экспрессирующей такую же конструкцию.

В некоторых воплощениях CD4⁺ Т-клетка включает CAR, описанный в настоящем описании, и такой CAR включает внутриклеточный сигнальный домен, подходящий для (например, оптимизированный для, например, ведущий к повышенной продолжительности существования в) CD4⁺ Т-клетки, например, домен ICOS. В некоторых воплощениях CD8⁺ Т-клетка включает CAR, описанный в настоящем описании, и такой CAR включает внутриклеточный сигнальный домен, подходящий для (например, оптимизированный для, например, ведущий к повышенной продолжительности существования в) CD8⁺ Т-клетки, например, домен 4-1BB, домен CD28 или другой костимулирующий домен иной, чем домен ICOS. В некоторых воплощениях CAR, описанный в настоящем описании, включает антигенсвязывающий домен, описанный в настоящем описании, например, CAR, включающий антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CLL-1, например, CAR из таблицы 2.

В одном аспекте в настоящем описании описывается способ лечения субъекта, например, субъекта, у которого рак. Способ включает введение указанному субъекту эффективного количества

1) CD4⁺ Т-клетки, включающей CAR (CAR^{CD4+}), включающей антигенсвязывающий домен, например, антигенсвязывающий домен, описанный в настоящем описании, например, антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CLL-1, например, антигенсвязывающий домен из таблицы 2;

трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, например, первый костимулирующий домен, например, домен ICOS; и

2) CD8⁺ Т-клетки, включающей CAR (CAR^{CD8+}), включающий антигенсвязывающий домен, например, антигенсвязывающий домен, описанный в настоящем описании, например, антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CLL-1, например, антигенсвязывающий домен из таблицы 2;

трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, например, второй костимулирующий домен, например, домен 4-1BB, домен CD28 или другой костимулирующий домен иной чем домен ICOS;

где CAR^{CD4+} и CAR^{CD8+} отличаются друг от друга.

Необязательно способ также включает введение

3) второй CD8⁺ Т-клетки, включающей CAR (второй CAR^{CD8+}), включающей

антигенсвязывающий домен, например, антигенсвязывающий домен, описанный в настоящем описании, например, антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CLL-1, например, антигенсвязывающий домен из таблицы 2;

трансмембранный домен и

внутриклеточный сигнальный домен, причем второй CAR^{CD8+} включает внутриклеточный сигнальный домен, например, костимулирующий сигнальный домен, отсутствующий в CAR^{CD8+}, и, необязательно, не включает сигнальный домен ICOS.

Терапевтическое применение

Ассоциированные с CLL-1 заболевания и/или расстройства

Настоящее изобретение относится, среди прочего, к композициям и способам лечения рака. В одном аспекте рак представляет собой гематологический рак, включая, но не ограничиваясь перечисленным, лейкоз (такой как острый миелогенный лейкоз (AML), хронический миелогенный лейкоз (CML), острый лимфоидный лейкоз, хронический лимфоидный лейкоз, острый лимфобластный В-клеточный лейкоз (В-клеточный острый лимфоидный лейкоз, BALL), острый лимфобластный Т-клеточный лейкоз (Т-клеточный острый лимфоидный лейкоз (TALL), В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, плазмочитарная миелома и миелодиспластический синдром) и злокачественные лимфопролиферативные состояния, включая лимфому (такую как множественная миелома, неходжкинская лимфома, лимфома Беркитта и мелкоклеточная и крупноклеточная лимфома).

Терапевтические применения

В одном аспекте изобретение относится к способам лечения заболевания, связанного с экспрессией CLL-1. В одном аспекте изобретение относится к способам лечения заболевания, при котором часть опухоли является отрицательной в отношении CLL-1, и часть опухоли является положительной в отношении CLL-1. Например, CAR по изобретению применим для лечения субъектов, которые подвергались лечению от заболевания, связанного с повышенной экспрессией CLL-1, причем субъект, который подвергался лечению в случае повышенных уровней CLL-1, показывал заболевание, связанное с повышенными уровнями CLL-1. В воплощениях CAR по изобретению применим для лечения субъектов, которые подвергались лечению от заболевания, связанного с повышенной экспрессией CLL-1, причем субъект, который подвергался лечению, связанному с экспрессией CLL-1, показывал заболевание, связанное с экспрессией CLL-1.

В одном аспекте изобретение относится к вектору, включающему CLL-1-CAR, операбельно связанный с промотором для экспрессии у млекопитающего иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток или НК-клеток. В одном аспекте изобретение относится к рекомбинантным иммунным эффекторным клеткам, например, Т-клеткам или НК-клеткам, экспрессирующим CLL-1-CAR для применения при лечении CLL-1-экспрессирующих опухолей, причем рекомбинантные иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки или НК-клетки, экспрессирующие CLL-1-CAR, называются CLL-1-CAR-экспрессирующей клеткой (например, CLL-1-CART или CLL-1-CAR-экспрессирующей НК-клеткой). В одном аспекте CLL-1-CAR-экспрессирующая клетка (например, CLL-1-CART или CLL-1-CAR-экспрессирующая НК-клетка) по изобретению способна контактировать с опухолевой клеткой по меньшей мере одним CLL-1-CAR по изобретению, экспрессированным на ее поверхности, так что CLL-1-CAR-экспрессирующая клетка (например, CLL-1-CART или CLL-1-CAR-экспрессирующая НК-клетка) таргетирует опухолевую клетку, и рост опухоли подавляется.

В одном аспекте изобретение относится к способу ингибирования роста CLL-1-

экспрессирующей опухолевой клетки, включающему контактирование опухолевой клетки с CLL-1-CAR-экспрессирующей клеткой (например, CLL-1-CART или CLL-1-CAR-экспрессирующей НК-клеткой) по настоящему изобретению, так что CLL-1-CAR-экспрессирующая клетка (например, CLL-1-CART или CLL-1-CAR-экспрессирующая НК-клетка) активируется в ответ на антиген и таргетирует раковую клетку, причем

рост опухоли подавляется.

В одном аспекте изобретение относится к способу лечения рака у субъекта. Способ включает введение субъекту CLL-1-CAR-экспрессирующей клетки (например, CLL-1-CART или CLL-1-CAR-экспрессирующей НК-клетки) по настоящему изобретению, так что субъект лечится от рака. Примером рака, который поддается лечению CLL-1-CAR-экспрессирующей клеткой (например, CLL-1-CART или CLL-1-CAR-экспрессирующей НК-клеткой) по изобретению является рак, ассоциированный с экспрессией CLL-1. В одном аспекте рак, ассоциированный с экспрессией CLL-1, представляет собой гематологический рак. В одном аспекте гематологический рак включает, но не ограничивается перечисленным, лейкоз (такой как острый миелогенный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, острый лимфоидный лейкоз, хронический лимфоидный лейкоз и миелодиспластический синдром) и злокачественные лимфопролиферативные состояния, включая лимфому (такую как множественная миелома, неходжкинская лимфома, лимфома Беркитта и мелкоклеточная и крупноклеточная лимфома). В других воплощениях гематологический рак может включать минимальное остаточное заболевание MRD, например, лейкоза, например, AML или MDS.

Изобретение включает тип клеточной терапии, где иммунную эффекторную клетку, например, Т-клетку или НК-клетку, генетически модифицируют для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), и CLL-1-CAR-экспрессирующую клетку (например, CLL-1-CART или CLL-1-CAR-экспрессирующую НК-клетку) вводят инфузией реципиенту, нуждающемуся в этом. Введенная инфузией клетка способна убивать опухолевые клетки у реципиента. В отличие от терапий с применением антител CAR-модифицированные клетки (например, Т-клетки или НК-клетки) способны к репликации *in vivo*, приводящей к длительной персистенции, которая может привести к стабильному регулированию опухоли. В различных аспектах иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки или НК-клетки), введенные пациенту, или их потомство сохраняются у пациента в течение по меньшей мере четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев, семи месяцев, восьми месяцев, девяти месяцев, десяти месяцев, одиннадцати месяцев, двенадцати месяцев, тринадцати месяцев, четырнадцати месяцев, пятнадцати месяцев, шестнадцати месяцев, семнадцати месяцев, восемнадцати месяцев, девятнадцати месяцев, двадцати месяцев, двадцати одного месяца, двадцати двух месяцев, двадцати трех месяцев, двух лет, трех лет, четырех лет или пяти лет после введения пациенту иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток или НК-клеток).

Изобретение также включает тип клеточной терапии, где иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки или НК-клетки) модифицируют, например, с помощью *in vitro* транскрибированной РНК для временной экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), и CLL-1-CAR-экспрессирующую клетку (например, CLL-1-CART или CLL-1-CAR-экспрессирующую НК-клетку) вводят инфузией реципиенту, нуждающемуся в этом. Введенная инфузией клетка способна убивать опухолевые клетки у реципиента. Таким образом, в различных аспектах иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки или НК-клетки), введенные пациенту, присутствуют в течение менее одного месца, например, три недели, две недели, одну неделю, после введения пациенту

иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток или НК-клеток).

Без желания привязываться к какой-либо определенной теории, противоопухолевая иммунная реакция, вызванная CAR-модифицированными иммунными эффекторными клетками (например, Т-клетками или НК-клетками), может представлять собой активную или пассивную иммунную реакцию, или с другой стороны, может происходить вследствие прямой против косвенной иммунной реакции. В одном аспекте CAR-трансдуцированные иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки или НК-клетки) проявляют специфическую секрецию провоспалительных цитокинов и сильную цитолитическую активность в ответ на экспрессию CLL-1 раковых клеток человека, сопротивление ингибированию растворимого CLL-1, опосредование сочувствия киллингу и умеренную регрессию установленной опухоли человека. Например, безантигенные опухолевые клетки в гетерогенной области CLL-1-экспрессирующей опухоли могут быть чувствительны к косвенной деструкции CLL-1-перенацеленными иммунными эффекторными клетками (например, Т-клетками или НК-клетками), которые ранее прореагировали против соседних антигенположительных раковых клеток.

В одном аспекте полностью человеческие CAR-модифицированные иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки или НК-клетки) по изобретению могут представлять собой тип вакцины для иммунизации *ex vivo* и/или терапии *in vivo* для млекопитающего. В одном аспекте млекопитающим является человек.

Что касается иммунизации *ex vivo*, перед введением клетки млекопитающему происходит по меньшей мере одно из следующего: i) экспансия клеток, ii) введение в клетки нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, или iii) криоконсервация клеток.

Процедуры *ex vivo* хорошо известны в технике и полнее обсуждаются ниже. Коротко, клетки берут у млекопитающего (например, человека) и генетически модифицируют (т.е., трансдуцируют или трансфицируют *in vitro*) вектором, экспрессирующим CAR, раскрытый в настоящем описании. CAR-Модифицированную клетку можно ввести реципиенту-млекопитающему для предоставления терапевтической пользы. Реципиент-млекопитающее может представлять собой человека, и CAR-модифицированная клетка может быть аутологична в отношении реципиента. С другой стороны, клетки могут быть аллогенными, сингенными или ксеногенными в отношении реципиента.

Процедура экспансии *ex vivo* кроветворных стволовых клеток и клеток-предшественников описана в пат. США № 5199942, включенном в настоящее описание в качестве ссылки, и может быть применена к клеткам по настоящему изобретению. В технике известны другие подходящие способы, поэтому настоящее изобретение не ограничивается каким-либо определенным способом экспансии клеток *ex vivo*. Коротко, культивирование и экспансия клеток *ex vivo* включают (1) собирание CD34+ кроветворных стволовых клеток и клеток-предшественников из забора периферической крови млекопитающего или эксплантатов костного мозга; и (2) размножение таких клеток *ex vivo*. Кроме клеточных факторов роста, описанных в пат. США № 5199942, для культивирования и экспансии клеток можно использовать другие факторы, такие как flt3 L, IL-1, IL-3 и лиганд c-kit.

Кроме применения вакцины на основе клеток в смысле иммунизации *ex vivo*, настоящее изобретение также относится к композициям и способам для иммунизации *in vivo* для вызывания иммунной реакции, направленной против антигена у пациента.

Как правило, клетки, активированные и размноженные так, как описано в настоящем описании, можно использовать при лечении и предупреждении заболеваний, которые появляются у индивидуумов, которые являются индивидуумами с ослабленным иммунитетом. В частности, CAR-модифицированные иммунные эффекторные клетки

(например, Т-клетки или NK-клетки) по изобретению используют при лечении заболеваний, расстройств и состояний, связанных с экспрессией CLL-1. В некоторых аспектах клетки по изобретению используют при лечении пациентов в опасности развития заболеваний, расстройств и состояний, связанных с экспрессией CLL-1. Таким образом, настоящее изобретение относится к способам лечения или предупреждения заболеваний, расстройств и состояний, связанных с экспрессией CLL-1, включающим введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества CAR-модифицированных иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток или NK-клеток) по изобретению. В одном аспекте CAR-экспрессирующие клетки, например, клетки CART или CAR-экспрессирующие NK-клетки, по изобретению можно использовать для лечения пролиферативного заболевания, такого как рак или злокачественность, или предракового состояния, такого как миелодисплазия, миелодиспластический синдром или прелейкозное гиперпролиферативное расстройство, гиперплазия или дисплазия, которые характеризуются аномальным ростом клеток.

В одном аспекте CAR-экспрессирующие клетки (например, клетки CART или CAR-экспрессирующие NK-клетки) по изобретению используют для лечения рака, причем рак представляет собой гематологический рак. Гематологические раковые состояния являются типами рака, такого как лейкоз и злокачественные лимфопролиферативные состояния, которые поражают кровь, костный мозг и лимфатическую систему.

В одном аспекте композиции и CAR-экспрессирующие клетки (например, клетки CART или CAR-экспрессирующие NK-клетки) по настоящему изобретению особенно применимы для лечения миелоидных лейкозов, AML и его подтипов, хронического миелоидного лейкоза (CML) и миелодиспластического синдрома (MDS).

Лейкоз можно классифицировать как острый лейкоз и хронический лейкоз. Острый лейкоз можно дополнительно классифицировать как острый миелогенный лейкоз (AML) и острый лимфоидный лейкоз (ALL). Хронический лейкоз включает хронический миелогенный лейкоз (CML) и хронический лимфоидный лейкоз (CLL). Другие родственные состояния включают миелодиспластический синдром (MDS, раньше известный как «предлейкоз»), которые составляют разнотипную коллекцию гематологических состояний, объединенных неэффективным продуцированием (или дисплазией) миелоидных клеток крови, и опасностью трансформации в AML.

Лимфомы представляют собой группу опухолей клеток крови, которые развиваются из лимфоцитов. Примеры лимфом включают неходжкинскую лимфому и ходжкинскую лимфому.

AML - злокачественная трансформация и нерегулируемая пролиферация аномально дифференцированных долгоживущих миелоидных клеток-предшественников приводит к высокому числу незрелых форм клеток крови в кровотоке и замещению здорового костного мозга злокачественными клетками. Симптомы включают усталость, бледность, слабые гематомы и кровотечение, лихордку и инфекцию; симптомы лейкозной инфильтрации присутствуют только у 5% пациентов (часто в виде кожных проявлений). Диагностической является проверка мазка периферической крови и костного мозга. Существующее лечение включает индукционную химиотерапию для достижения ремиссии и постремиссионную химиотерапию (с трансплантацией стволовых клеток или без нее) для того, чтобы избежать рецидива.

AML имеет ряд подтипов, которые отличаются друг от друга морфологией, иммунофенотипом и цитохимией. Описано пять классов на основании превалирующего типа клеток, включающих классы миелоидный, миелоидмоноцитарный, моноцитарный, эритроидный и мегакариоцитарный.

Степени индукции ремиссии колеблются от 50 до 85%. Длительное выживание без болезни, как сообщается, имеет место у 20-40% пациентов и повышается до 40-50% у более молодых пациентов с трансплантацией стволовых клеток.

5 Прогностические факторы помогают определить протокол и интенсивность лечения; пациентам с сильно отрицательными прогностическими особенностями обычно дают более интенсивные формы терапии, поскольку возможное благоприятное действие, как полагают, оправдывает повышенную токсичность лечения. Наиболее важным прогностическим фактором является кариотип лейкозных клеток; благоприятные кариотипы включают t(15;17), t(8;21) и inv16 (p13;q22). Негативные факторы включают
10 возраст, предшествующую миелодиспластическую фазу, вторичный лейкоз, высокое число WBC и отсутствие телец Ауэра.

Начальная терапия пытается вызвать ремиссию и отличается больше всего в случае ALL тем, что AML реагирует на немногие лекарственные средства. Основная схема индукции включает цитарабин непрерывной IV инфузией или в высоких дозах в течение
15 5-7 дней; в это же время дают даунорубицин или идарубицин IV в течение 3 дней. Некоторые схемы включают 6-тиогуанин, этопозид, винкристин и преднизон, но их вклад неясен. Лечение обычно приводит к существенной миелосупрессии с инфекцией или кровотечением; существует значительная латентность перед извлечением костного мозга. В это время жизненно важным является тщательное превентивное и
20 поддерживающее лечение.

Хронический миелогенный (или миелоидный) лейкоз (CML) также известен как хронический гранулоцитарный лейкоз и характеризуется как рак белых клеток крови. Обычные схемы лечения CML включают ингибиторы тирозинкиназ Ber-Abl, иматиниб (Gleevec®), дазатиниб и нилотиниб. Ингибиторы тирозинкиназ Ber-Abl специфически
25 применимы для больных CML с транслокацией филадельфийской хромосомы.

Миелодиспластические синдромы (MDS) представляют собой гематологические клинические состояния, характеризующиеся нарушенным и неэффективным гемопоэзом или продуцированием крови. Так, необратимо снижается число и качество
30 кровеобразующих клеток. У некоторых пациентов с MDS может развиться тяжелая анемия, в то время как другие являются бессимптомными.

Схема классификации MDS известна в технике, причем критерии обозначают отношение или частоту встречаемости определенных типов клеток крови, например, миелобластов, моноцитов и предшественников красных клеток. MDS включает
35 рефрактерную анемию, рефрактерную анемию с кольцевыми сидеробластами, рефрактерную анемию с избыточными бластами, рефрактерную анемию с избыточными бластами при трансформации, хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML).

Лечение MDS изменяется в связи с тяжестью симптомов. Агрессивные формы лечения для пациентов, испытывающих тяжелые симптомы, включают трансплантаты костного мозга и поддерживающее лечение с поддержкой продуктами крови (например,
40 переливаниями крови) и гемопоэтическими факторами роста (например, эритропоэтином). Часто используют другие средства для лечения MDS: 5-азациитидин, децитабин и леналидомид. В некоторых случаях также можно вводить хелаторы железа (десферал®) и деферазирокс (Exjade®).

В другом воплощении CAR-экспрессирующие клетки (например, клетки CART или
45 CAR-экспрессирующие НК-клетки) по настоящему изобретению используют для лечения раковых заболеваний или лейкозов лейкозными стволовыми клетками. Например, лейкозными стволовыми клетками являются CD34⁺/CD38⁺ лейкозные клетки.

Настоящее изобретение относится, среди прочего, к композициям и способам лечения

рака. В одном аспекте рак представляет собой гематологический рак включающий, но не ограничивающийся перечисленным, лейкоз (такой как острый миелогенный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, острый лимфоидный лейкоз, хронический лимфоидный лейкоз и миелодиспластический синдром) и злокачественные лимфопролиферативные состояния, включая лимфому (такую как множественная миелома, неходжкинская лимфома, лимфома Беркитта и мелкоклеточная и крупноклеточная лимфома).

В одном аспекте CAR-экспрессирующие клетки (например, клетки CART или CAR-экспрессирующие NK-клетки) по изобретению можно использовать для лечения других раковых заболеваний и злокачественностей, таких как, но без ограничения, например, острый лейкоз, включая, но не ограничиваясь перечисленным, В-клеточный острый лимфоидный лейкоз («BALL»), Т-клеточный острый лимфоидный лейкоз («TALL»), острый лимфоидный лейкоз (ALL); один или больше хронических лейкозов, включая, но не ограничиваясь перечисленным, например, хронический миелогенный лейкоз (CLL); другие гематологические раковые заболевания или гематологические состояния, включая, но не ограничиваясь перечисленным, В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, неоплазму бластных плазмцитоподобных дендритных клеток, лимфому Беркетта, диффузную крупно-В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, волсковоклеточный лейкоз, мелкоклеточную или крупноклеточную фолликулярную лимфому, злокачественные лимфопролиферативные состояния, MALT-лимфому, лимфому из клеток мантии, лимфому маргинальной зоны, множественную лимфому, миелодисплазию и миелодиспластический синдром, неходжкинскую лимфому, плазмобластную лимфому, неоплазму плазмцитоподобных дендритных клеток, макроглобулинемию Вальденстрема и «предлейкоз», которые представляют собой разнотипную коллекцию гематологических состояний, объединенных неэффективным продуцированием (или дисплазией) миелоидных клеток крови, и т.п.. CAR-модифицированные иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки или NK-клетки) по настоящему изобретению можно вводить или одни или в виде фармацевтической композиции в комбинации с разбавителями и/или другими компонентами, такими как IL-2 или другие цитокины, или клеточные популяции.

Настоящее изобретение также относится к способам ингибирования пролиферации или уменьшения популяции CLL-1-экспрессирующих клеток, включающим контактирование популяции клеток, включающей CLL-1-экспрессирующую клетку, с CLL-1-CAR-экспрессирующей клеткой (например, клеткой CLL-1-CART или CLL-1-CAR-экспрессирующей NK-клеткой) по изобретению, которая связывается с CLL-1-экспрессирующей клеткой. В конкретном аспекте настоящее изобретение относится к способам ингибирования пролиферации или уменьшения популяции CLL-1-экспрессирующих клеток, включающим контактирование популяции CLL-1-экспрессирующих раковых клеток с CLL-1-CAR-экспрессирующей клеткой (например, клеткой CLL-1-CART или CLL-1-CAR-экспрессирующей NK-клеткой) по изобретению, которая связывается с CLL-1-экспрессирующей клеткой. В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам ингибирования пролиферации или уменьшения популяции раковых CLL-1-экспрессирующих клеток, включающим контактирование популяции CLL-1-экспрессирующих раковых клеток с CLL-1-CAR-экспрессирующей клеткой (например, клеткой CLL-1-CART или CLL-1-CAR-экспрессирующей NK-клеткой) по изобретению, которая связывается с CLL-1-экспрессирующей клеткой. В некоторых аспектах CLL-1-CAR-экспрессирующая клетка (например, клетка CLL-1-CART или CLL-1-CAR-экспрессирующая NK-клетка) по изобретению уменьшает количество,

число, количество или процент клеток и/или раковых клеток по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%, у субъекта с или животной модели миелоидного лейкоза или другого рака, ассоциированного с CLL-1-экспрессирующими клетками, относительно отрицательного контроля. В одном аспекте субъектом является человек.

Настоящее изобретение также относится к способам предупреждения, лечения и/или оказания помощи при заболевании, ассоциированном с CLL-1-экспрессирующими клетками (например, гематологическом раке или атипичном раке с экспрессией CLL-1), включающим введение субъекту, нуждающемуся в этом, CLL-1-CAR-экспрессирующей клетки (например, клетки CLL-1-CART или CLL-1-CAR-экспрессирующей NK-клетки) по изобретению, которая связывается с CLL-1-экспрессирующей клеткой. В одном аспекте субъектом является человек. Неограничительные примеры расстройств, связанных с CLL-1-экспрессирующими клетками, включают аутоиммунные расстройства (такие как волчанка), воспалительные расстройства (такие как аллергии и астма) и раковые заболевания (такие как гематологические раковые заболевания или атипичные раковые заболевания с экспрессией CLL-1).

Настоящее изобретение также относится к способам предупреждения, лечения и/или оказания помощи при заболевании, ассоциированном с CLL-1-экспрессирующими клетками, включающим введение субъекту, нуждающемуся в этом, CLL-1-CAR-экспрессирующей клетки (например, клетки CLL-1-CART или CLL-1-CAR-экспрессирующей NK-клетки) по изобретению, которая связывается с CLL-1-экспрессирующей клеткой. В одном аспекте субъектом является человек.

Настоящее изобретение относится к способам предупреждения рецидива рака, ассоциированного с CLL-1-экспрессирующими клетками, включающим введение субъекту, нуждающемуся в этом, CLL-1-CAR-экспрессирующей клетки (например, клетки CLL-1-CART или CLL-1-CAR-экспрессирующей NK-клетки) по изобретению, которая связывается с CLL-1-экспрессирующей клеткой. В одном аспекте способы включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, CLL-1-CAR-экспрессирующей клетки (например, клетки CLL-1-CART или CLL-1-CAR-экспрессирующей NK-клетки), описанной в настоящем описании, которая связывается с CLL-1-экспрессирующей клеткой, в комбинации с эффективным количеством другого лечения лекарственными средствами.

Комбинированные терапии

CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, можно использовать в комбинации с другими известными средствами и терапиями. Вводимое «в комбинации» при использовании в настоящем описании означает, что субъекту доставляют два (или больше) различных лечения в ходе недуга субъекта от расстройства, например, два или больше лечения доставляют субъекту после того, как у субъекта диагностировано расстройство, и до того, как расстройство вылечили или устранили, или лечение прекратили по другим причинам. В некоторых воплощениях все еще происходит доставка одного лечения, когда начинается доставка второго лечения, так что имеет место перекрывание в смысле введения. Иногда в настоящем описании это называется «совместной» или «одновременной доставкой». В некоторых воплощениях любого случая лечение является более эффективным из-за комбинированного введения. Например, второе лечение является более эффективным, например, равнозначный эффект виден с менее значительным вторым лечением, или второе лечение ослабляет симптомы в большей степени, чем это можно видеть, если второе лечение дают в

отсутствие первого лечения, или аналогичную ситуацию видят с первым лечением. В некоторых воплощениях доставка такова, что ослабление симптома или другого параметра, связанного с расстройством, большее, чем можно было бы наблюдать с одним лечением, доставленным в отсутствие другого. Эффект двух лечений может быть частично аддитивным, полностью аддитивным или большим, чем аддитивный. Доставка может быть такой, что эффект от первого доставленного лечения все еще обнаруживается, когда доставляют второе лечение.

CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство можно вводить совместно в одной или в отдельных композициях, или последовательно. В случае последовательного введения CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, можно вводить первой, и дополнительное средство можно вводить вторым, или порядок введения может быть обратным.

CAR-терапию и/или другие терапевтические средства, процедуры или способы воздействия можно назначать в периоды активного расстройства или в период ремиссии или менее активной болезни. CAR-терапию можно назначать до другого лечения, одновременно с лечением, после лечения или во время ремиссии расстройства.

При назначении в комбинации CAR-терапию и дополнительное средство (например, второе или третье средство) или все можно вводить в количестве или дозе, которая выше, ниже или такая же, как количество или дозировка каждого средства, используемого отдельно, например, как монотерапию. В некоторых воплощениях количество или дозировка CAR-терапии, дополнительного средства (например, второго или третьего средства) или всех ниже (например, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40% или по меньшей мере на 50%), чем количество или дозировка каждого средства, используемого отдельно, например, как монотерапию. В других воплощениях количество или дозировка CAR-терапии, дополнительного средства (например, второго или третьего средства) или всех, которые приводят к желательному эффекту (например, лечению рака), ниже (например, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40% или по меньшей мере на 50%), чем количество или дозировка каждого средства, используемого отдельно, например, как монотерапию, требуемое для достижения такого же терапевтического эффекта.

В других аспектах CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, можно использовать в схеме лечения в комбинации с операцией, химиотерапией, облучением, иммуносупрессивными средствами, такими как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, микофенолат и FK506, антитела или другие иммунологические средства, такие как CAMPATH, анти-CD3-антитела или другие терапии антителами, цитокины, флударабин, рапамицин, микофеноловая кислота, стероиды, FR901228, цитокины, и излучением, пептидной вакциной, такой как описанная в Izumoto et al., 2008, J. Neurosurg., 108: 963-971.

В некоторых случаях соединения по настоящему изобретению комбинируют с другими терапевтическими средствами, такими как другие противораковые средства, противоаллергические средства, средства от тошноты (или противорвотные средства), средства от боли, цитопротекторы и их комбинации.

В одном воплощении CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, можно использовать в комбинации с химиотерапевтическим средством. Примеры химиотерапевтических средств включают антрациклин (например, доксорубин (например, липосомальный доксорубин)), винкаалкалоид (например,

винбластин, винкристин, виндезин, винорелбин), алкилирующее средство (например, циклофосфамид, декарбазин, мелфалан, ифосфамид, темозолмид), антитело к иммунной клетке (например, алемтузамаб, гемтузумаб, ритуксимаб, офатумумаб, тозитумомаб, брентуксимаб), антиметаболит (включая, например, антагонисты фолиевой кислоты, аналоги пиримидина, аналоги пурина и ингибиторы аденозиндеаминазы (например, флударабин), ингибитор mTOR, агонист белка, родственного TNFR, индуцированного гликокортикоидом TNFR (GITR), ингибитор протеасом (например, аklациномицин A, глитотоксин или бортезомиб), иммуномодулятор, такой как талидомид или производное талидомида (например, леналидомид).

Основные химиотерапевтические средства, рассматриваемые для применения в комбинированных терапиях, включают анастрозол (аримидекс®), бикалутамид (касодекс®), блеомицина сульфат (блеоксан®), бусульфан (милеран®), инъекцию бисульфана (бусуфлекс®), капецитабин (кселода®), N4-пентоксикарбонил-5-дезоксис-5-фторцитидин, карбоплатин (параплатин®), кармустин (BiCNU®), хлорамбуцил (лейкеран®), цисплатин (платинол®), кладрибин (лейстатин®), циклофосфамид (цитоксан® или неозар®), цитарабин, цитозин-арабинозид (цитозар-U®), цитарабина липосомами инъекцию (ДероСуг®), дакарбазин (DTIC-Dome®), дактиномицин (актиномицин D, космеган), даунорубицина гидрохлорид (церубицин®), даунорубицина цитрата липосомами инъекцию (DaunoXome®), дексаметазон, доцетаксел (таксотер®), доксорубицина гидрохлорид (адриамицин®, рубекс®), этопозид (вепезид®), флударабина фосфат (флудара®), 5-фторурацил (адруцил®, эфудекс®), флутамид (эулексин®), тезактибин, гемцитабин (дифтордезоксифитидин), гидроксимочевину (гидреа®), идарубицин (идамицин®), ифосфамид (IPEX®), иринотекан (камптосар®), L-аспарагиназу (ELSPAR®), лейковорин кальция, мелфалан (алкеран®), 6-меркаптопурин (пуринэтол®), метотрексат (фолекс®), митоксантрон (новантрон®), милотарг, паклитаксел (таксол®), фоеникс (иттрий90/MX-DTPA), пентостатин, полифепрозан с кармустином имплантат (глиадел®), тамоксифена цитрат (нолвадекс®), тенипозид (вумон®), 6-тиогуанин, тиотепу, тирапазамин (тиразон®), топотекана гидрохлорид для инъекции (гикамтин®), винбластин (велбан®), винкристин (онковин®) и винорелбин (навелбин®).

Лечение комбинацией химиотерапевтического средства и клетки, экспрессирующей молекулу CLL-1-CAR, описанную в настоящем описании, можно использовать для лечения гематологического рака, описанного в настоящем описании, например, AML. В воплощениях комбинация химиотерапевтического средства и клетки, экспрессирующей CLL-1-CAR, применима для таргетинга, например, киллинга, раковых стволовых клеток, например, лейкозных стволовых клеток, например, у субъектов с AML. В воплощениях комбинация химиотерапевтического средства и клетки, экспрессирующей CLL-1-CAR, применима для лечения минимального остаточного заболевания (MRD). MRD соотносится с небольшим числом раковых клеток, которые остаются у субъекта во время лечения, например, химиотерапии, или после лечения. MRD часто является основной причиной рецидива. Настоящее изобретение относится к способу лечения рака, например, MRD, включающему введение химиотерапевтического средства в комбинации с CLL-1-CAR-экспрессирующей клеткой, например, описанной в настоящем описании.

В одном воплощении химиотерапевтическое средство вводят до введения клетки, экспрессирующей молекулу CAR, например, молекулу CAR, описанную в настоящем описании. В схемах приема химиотерапевтического средства, где желательно более одного введения химиотерапевтического средства, схема приема химиотерапевтического средства начинается или завершается до введения клетки, экспрессирующей молекулу

CAR, например, молекулу CAR, описанную в настоящем описании. В воплощениях химиотерапевтическое средство вводят по меньшей мере за 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 20 дней, 25 дней или 30 дней до введения клетки, экспрессирующей молекулу CAR. В воплощениях схема приема химиотерапевтического средства начинается или завершается по меньшей мере за 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 20 дней, 25 дней или 30 дней до введения клетки, экспрессирующей молекулу CAR. В воплощениях химиотерапевтическое средство представляет собой химиотерапевтическое средство, которое усиливает экспрессию CLL-1 на раковых клетках, например, опухолевых клетках, например, по сравнению с экспрессией CLL-1 на здоровых или нераковых клетках. Экспрессию CLL-1 можно определить, например, анализом методом иммуногистохимического окрашивания или проточной цитометрии. Например, химиотерапевтическое средство представляет собой цитарабин (Ara-C).

Противораковые средства, особенно интересные для комбинаций с соединениями по настоящему изобретению, включают антиметаболиты; лекарственные средства, которые ингибируют или кальций-зависимую фосфатазу кальцинеурин или киназу p7056 (FK506), или ингибирует киназу p7056; алкилирующие средства; ингибиторы mTOR; иммуномодуляторы; антрациклины; винкаалкалоиды; ингибиторы протеасом; агонисты G1FR; ингибиторы протеинтирозинфосфатазы; ингибитор киназы CDK4; ингибитор киназы ВТК; ингибитор киназы MKN; ингибитор киназы DGK или онколитический вирус.

Примеры антиметаболитов включают, без ограничения, антагонисты фолиевой кислоты (также называемые в настоящем описании антифолатами), аналоги пиримидина, аналоги пурина и ингибиторы аденозиндеаминазы; метотрексан (ревматрекс®, трексал®), 5-фторурацил (адруцил®, эфудекс®, флюороплекс®), флоксуридин (FUDF®), цитарабин (цитозар-U®, тарабин PFS®), 6-меркаптопурин (пуринетол®), 6-тиогуанидин (тиогуанин таблоид®), флударабина фосфат (флудара®), пентостатин (нипент®), пеметрексед (алимта®), ралтитрексед (томудекс®), кладрибин (клофарекс®, клолар®), капецетабин (кселода®), неларабин (арранон®), азациитидин (видаза®) и гемцитабин (гемзар®). Предпочтительные антиметаболиты включают, например, 5-фторурацил (адруцил®, эфудекс®, флюороплекс®), флоксуридин (FUDF®), капецетабин (кселода®), пеметрексед (алимта®), ралтитрексед (томудекс®) и гемцитабин (гемзар®).

Примеры алкилирующих средств включают, без ограничения, азотные аналоги горчичного газа, производные этиленмина, алкилсульфонаты, нитрозомочевины и триазины; урацилмустард (аминоурацилмустард®, хлорэтаминацил®, деметилдопан®, десметилдопан®, Наемантанамин®, нордопан®, Uracil nitrogene mustard®, Uracillost®, Uracilmostaza®, урамустин®), хлорметил (мустарген®), циклофосфамид (цитоксан®, неозар®, клафен®, эндоксан®, процитокс®, ревиммун™), ифосфамид (митоксана®), мелфалан (алкеран®), хлорамбуцил (лейкеран®), пипоброман (амедел®, верцит®), триэтиленмеламин (Hemel®, гексалин®, гексастат®), триэтилентеофосфорамин, темозоломид (темодар®), тиотепу (тиоплекс®), бусульфан (бусилвекс®, милеран®), кармустин (BiCNU®), ломустин (SeeNU®), стрептозоцин (заносар®) и дакарбазин (DTIC-Dome®). Дополнительные примеры алкилирующих средств включают, без ограничения, оксалиплатин (элоксатин®), темозоломид (темодар® и темодал®), дактиномицин (также известный как актиномицин-D, космоген®), мелфалан (также известный как L-РАМ, L-сарколизин и фенилаланин мустард, алкеран®), алтретамин (также известный как гексаметилмеламин (НММ), гексалин®) кармустин (BiCNU®),

бендамустин (треанда®), бусульфан (бусуфлекс® и милеран®), карбоплатин (параплатин®), ломустин (также известный как CCNU, CeeNU®), цисплатин (также известный как CDDP, платинол® и платинол®-AQ), хлорамбуцил (лейкеран®), циклофосфамид (цитоксан® и неозар®), дакарбазин (также известный как DTIC, DIC и карбоксаимид имидазола, DTIC-Dome®), ифосфамид (ифекс®), преднумустин, прокарбазин (матулан®), мехлорэтамин (также известный как азотистый иприт, мкстин и мехлорэтамина гидрохлорид, мустарген®), стрептозоцин (заносар®), тиотепу (также известную как тиофосфамид, TESPА и TSPA, тиоплекс®), циклофосфамид (эндоксан®, цитоксан®, неозар®, процитокс®, ревиммун®) и бендамустин HCl (треанда®).

В воплощениях CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с флударабином, циклофосфамидом и/или ритуксимабом. В воплощениях CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с флударабином, циклофосфамидом и ритуксимабом (FCR). В воплощениях субъект имеет CLL. Например, субъект имеет делецию в коротком плече хромосомы 17 (del(17p), например, в лейкозной клетке). В других примерах субъект не имеет del(17p). В воплощениях у субъекта имеется лейкозная клетка, включающая мутацию в гене варибельного участка тяжелой цепи иммуноглобулина ($Ig V_H$). В других воплощениях у субъекта не имеется лейкозной клетки, включающей мутацию в гене варибельного участка тяжелой цепи иммуноглобулина ($Ig V_H$). В воплощениях флударабин вводят в дозировке примерно 10-15 мг/м² (например, примерно 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45 или 45-50 мг/м²), например, внутривенно. В воплощениях циклофосфамид вводят в дозировке примерно 200-300 мг/м² (например, примерно 200-225, 225-250, 250-275 или 275-300 мг/м²), например, внутривенно. В воплощениях ритуксимаб вводят в дозировке примерно 400-600 мг/м² (например, примерно 400-450, 450-500, 500-550 или 550-600 мг/м²), например, внутривенно.

В воплощениях CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с бендамустином и ритуксимабом. В воплощениях субъект имеет CLL. Например, субъект имеет делецию в коротком плече хромосомы 17 (del(17p), например, в лейкозной клетке). В других примерах субъект не имеет del(17p). В воплощениях у субъекта имеется лейкозная клетка, включающая мутацию в гене варибельного участка тяжелой цепи иммуноглобулина ($Ig V_H$). В других воплощениях у субъекта не имеется лейкозной клетки, включающей мутацию в гене варибельного участка тяжелой цепи иммуноглобулина ($Ig V_H$). В воплощениях бендамустин вводят в дозировке примерно 70-110 мг/м² (например, примерно 70-80, 80-90, 90-100 или 100-110 мг/м²), например, внутривенно. В воплощениях ритуксимаб вводят в дозировке примерно 400-600 мг/м² (например, примерно 400-450, 450-500, 500-550 или 550-600 мг/м²), например, внутривенно.

В воплощениях CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с ритуксимабом, циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и/или кортикостероидом (например, преднизолом). В воплощениях CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с ритуксимабом, циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолом (R-CHOP). В воплощениях субъект имеет диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL). В воплощениях субъект имеет необъемную

ограниченную стадию диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (например, включающую опухоль, имеющую размер/диаметр менее 7 см). В воплощениях субъекта лечат облучением в комбинации с R-CHOP. Например, субъекту вводят R-CHOP (например, 1-6 циклов, например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 циклов R-CHOP) с последующим облучением. В некоторых случаях субъекту вводят R-CHOP (например, 1-6 циклов, например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 циклов R-CHOP) после облучения.

В воплощениях CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с этопозидом, преднизолом, винкристином, циклофосфамидом, доксорубицином и/или ритуксимабом. В воплощениях CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с этопозидом, преднизолом, винкристином, циклофосфамидом, доксорубицином и ритуксимабом (EPOCH-R). В воплощениях CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с подобранной дозой EPOCH-R (DA-EPOCH-R). В воплощениях субъект имеет В-клеточную лимфому, например, агрессивную В-клеточную лимфому с реаранжированным Мус.

В воплощениях CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с ритуксимабом и/или леналидомидом. Леналидомид ((RS)-3-(4-амино-1-оксо-1,3-дигидро-2H-изоиндол-2-ил)пиперидин-2,6-дион) является иммуномодулятором. В воплощениях CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с ритуксимабом и леналидомидом. В воплощениях субъект имеет фолликулярную лимфому (FL) или лимфому из клеток мантии (MCL). В воплощениях субъект имеет FL и предварительно не лечился противораковой терапией. В воплощениях леналидомид вводят в дозировке примерно 10-20 мг (например, 10-15 или 15-20 мг), например, ежедневно. В воплощениях ритуксимаб вводят в дозировке примерно 350-550 мг/м² (например, 350-375, 375-400, 400-425, 425-450, 450-475 или 475-500 мг/м²), например, внутривенно.

Примеры ингибитора mTOR включают, например, темсиролимус, ридафоролимус (формально известный как деферолимус (1*R*,2*R*,4*S*)-4-[(2*R*)-2-[(1*R*,9*S*,12*S*,15*R*,16*E*,18*R*,19*R*,21*R*,23*S*,24*E*,26*E*,28*Z*,30*S*,32*S*,35*R*)-1,18-дигидрокси-19,30-диметокси-15,17,21,23,29,35-гексаметил-2,3,10,14,20-пентаоксо-11,36-диокса-4-азатрицикло[30.3.1.0^{4,9}] гексатираконта-16,24,26,28-тетраен-12-ил]пропил]-2-метоксициклогексилдиметилфосфинат, также известный как AP23573 и MK8669, и описанный в публикации РСТ № WO 03/064383); эверолимус (афинитор® или RAD001); рапамицин (AY22989, сиролимус®); симапимод (CAS 164301-51-3); эмсиролимус, (5-{2,4-бис[(3*S*)-3-метилморфолин-4-ил]пиридо[2,3-*d*]пиримидин-7-ил}-2-метоксифенил) метанол (AZD8055); 2-амино-8-[*транс*-4-(2-гидроксиэтокси)циклогексил]-6-(6-метокси-3-пиридирил)-4-метилпиридо[2,3-*d*]пиримидин-7(8*H*)-он (PF04691502, CAS 1013101-36-4); и *N*²-[1,4-диоксо-4-[[4-(4-оксо-8-фенил-4*H*-1-бензопиран-2-ил)морфолиний-4-ил]метокси]бутил]-L-аргинилглицин-L-α-аспартил-L-серин (SEQ ID NO: 313), внутреннюю соль (SF1126, CAS 936487-67-1) и XL765.

Примеры иммуномодуляторов включают, например, афутузумаб (доступный от Roche®); пегфилграстим (Neulasta®); леналидомид (CC-5013, ревимид®); талидомид (таломид®), актимид (CC4047) и IRX-2 (смесь цитокинов человека, включающая интерлейкин 1, интерлейкин 2 и интерферон γ, CAS 951209-71-5, доступный от IRX Therapeutics).

Примеры антрациклинов включают, например, доксорубин (адриамицин® и Rubex®); блеомицин (леноксан®); даунорубин (даунорубин гидрохлорид,

дауномицин и рубидомицина гидрохлорид, церубидин®); даунорубицин липосомальный (липосомальная форма даунорубицина цитрата, DaunoXome®); митоксантрон (DHAD, новантрон®); эпирубицин (елленце™; идарубицин (идамицин®, идамицин PFS®); митомицин С (мутамицин®); гелданамицин; гербимицин; равидомицин и

5 дезацетилраидамицин.

Примеры винкаалкалоидов включают, например, винорелбина тартрат (навелбин®), винкристин (онковин®) и виндезин (элдизин®), винбластин (также известный как винбластина сульфат, винкалейкобластин и VLB, алкабан-AQ® и велбан®) и винорелбин (навелбин®).

10 Примеры ингибиторов протеосом включают бортезомиб (велкад®), карфизомиб (PX-171-007, (S)-4-метил-N-((S)-1-(((S)-4-метил-1-((R)-2-метилоксиран-2-ил)-1-оксопентан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)-2-((S)-2-(2-морфолиноацетиамидо)-4-фенилбутанамидо)пентанамид); маризомиб (NPI-0052); иксазомиба цитрат (MLN-9708); деланзомиб (CEP-18770) и O-метил-N-[(2-метил-5-тиазолил)карбонил]-L-серил-O-метил-N-[(1S)-2-[(2R)-2-метил-2-оксиранил]-2-оксо-1-(фенилметил)этил]-L-серидамид (ONX-0912).

В воплощениях CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с брентуксимабом. Брентуксимаб представляет собой антителосодержащее лекарственное средство - конъюгат анти-CD30 антитела и

20 монометилауристатина E. В воплощениях субъект имеет ходжкинскую лимфому (HL), например, рецидивную или рефрактерную HL. В воплощениях у субъекта имеется CD30+ HL. В воплощениях субъект претерпел трансплантацию аутологичных стволовых клеток (ASCT). В воплощениях субъект не подвергался ASCT. В воплощениях брентуксимаб вводят в дозировке примерно 1-3 мг/кг (например, примерно 1-1,5, 1,5-2, 2-2,5 или 2,5-3

25 мг/кг), например, внутривенно, например, каждые 3 недели.

В воплощениях CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с брентуксимабом и дакарбазином или в комбинации с брентуксимабом и бендамустином. Дакарбазин представляет собой алкилирующее средство с химическим названием 5-(3,3-диметил-1-триазенил)имидазол-4-карбоксамид.

30 Бендамустин представляет собой алкилирующее средство с химическим названием 4-[5-[бис(2-хлорэтил)амино]-1-метилбензимидазол-2-ил]бутановая кислота. В воплощениях субъект имеет ходжкинскую лимфому (HL). В воплощениях субъекта ранее не лечили противораковой терапией. В воплощениях субъект в возрасте по меньшей мере 60 лет, например, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или старше. В воплощениях дакарбазин вводят в дозировке

35 примерно 300-450 мг/м² (например, примерно 300-325, 325-350, 350-375, 375-400, 400-425 или 425-450 мг/м²), например, внутривенно. В воплощениях бендамустин вводят в дозировке примерно 75-125 мг/м² (например, примерно 75-100 или 100-125 мг/м², например, примерно 90 мг/м²), например, внутривенно. В воплощениях брентуксимаб

40 вводят в дозировке примерно 1-3 мг/м² (например, примерно 1-1,5, 1,5-2, 2-2,5 или 2,5-3 мг/м²), например, внутривенно, например, каждые 3 недели.

В некоторых воплощениях CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с ингибитором CD20, например, анти-CD20 антителом (например, анти-CD20 моно- или биспецифическим антителом) или его

45 фрагментом. Примеры анти-CD20 антител включают, но не ограничиваются перечисленным, ритуксимаб, офатумумаб, окрелизумаб, велтузумаб, обинутузумаб, TRU-015 (Trubion Pharmaceuticals), окаратузумаб и Pro131921 (Genentech). См., например,

Lim et al., Haematologica, 95.1(2010): 135-43).

В некоторых воплощениях анти-CD20 антитело включает ритуксимаб. Ритуксимаб представляет собой химерное мышинное/человеческое антитело IgG1-каппа, которое связывается с CD20 и вызывает цитолиз CD20-экспрессирующей клетки, например, как описано в www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/103705s5311lbl.pdf. В воплощениях CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с ритуксимабом. В воплощениях субъект имеет CLL или SLL.

В некоторых воплощениях ритуксимаб вводят внутривенно, например, внутривенной инфузией. Например, каждая инфузия предоставляет 500-2000 мг (например, примерно 500-550, 550-600, 600-650, 650-700, 700-750, 750-800, 800-850, 850-900, 900-950, 950-1000, 1000-1100, 1100-1200, 1200-1300, 1300-1400, 1400-1500, 1500-1600, 1600-1700, 1700-1800, 1800-1900 или 1900-2000 мг) ритуксимаба. В некоторых воплощениях ритуксимаб вводят в дозе 150 мг/м^2 - 750 мг/м^2 , например, примерно 150 мг/м^2 - 750 мг/м^2 , e.g., about 150 - 175 мг/м^2 , 175 - 200 мг/м^2 , 200 - 225 мг/м^2 , 225 - 250 мг/м^2 , 250 - 300 мг/м^2 , 300 - 325 мг/м^2 , 325 - 350 мг/м^2 , 350 - 375 мг/м^2 , 375 - 400 мг/м^2 , 400 - 425 мг/м^2 , 425 - 450 мг/м^2 , 450 - 475 мг/м^2 , 475 - 500 мг/м^2 , 500 - 525 мг/м^2 , 525 - 550 мг/м^2 , 550 - 575 мг/м^2 , 575 - 600 мг/м^2 , 600 - 625 мг/м^2 , 625 - 650 мг/м^2 , 650 - 675 мг/м^2 или 675 - 700 мг/м^2 , где м^2 показывает площадь поверхности тела субъекта. В некоторых воплощениях ритуксимаб вводят с интервалами между дозами в по меньшей мере 4 дня, например, 4, 7, 14, 21, 28, 35 дней, или большими. Например, ритуксимаб вводят с интервалом между дозами в по меньшей мере 0,5 недели, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 недель, или большим. В некоторых воплощениях ритуксимаб вводят в дозе и интервалом между дозами, описанными в настоящем описании, в течение периода времени, например, по меньшей мере 2 недели, например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 недель или дольше. Например, ритуксимаб вводят в дозе и интервалом между дозами, описанными в настоящем описании, в целом по меньшей мере 4 дозы на цикл лечения (например, по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или больше доз на цикл лечения).

В некоторых воплощениях анти-CD20 антитело включает офатумумаб. Офатумумаб представляет собой анти-CD20 IgG1-к человеческое моноклональное антитело с молекулярной массой приблизительно 149 кД. Например, офатумумаб получают с использованием технологии с трансгенными мышами и гибридной технологии, и экспрессируют и очищают из рекомбинантной муриновой клеточной линии (NSO). См., например, www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/125326lbl.pdf, и идентификатор клинического испытания номер NCT01363128, NCT01515176, NCT01626352 и NCT01397591. В воплощениях CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с офатумумабом. В воплощениях субъект имеет CLL или SLL.

В некоторых воплощениях офатумумаб вводят внутривенной инфузией. Например, каждая инфузия предоставляет примерно 150-3000 мг (например, примерно 150-200, 200-250, 250-300, 300-350, 350-400, 400-450, 450-500, 500-550, 550-600, 600-650, 650-700, 700-750, 750-800, 800-850, 850-900, 900-950, 950-1000, 1000-1200, 1200-1400, 1400-1600, 1600-1800, 1800-2000, 2000-2200, 2200-2400, 2400-2600, 2600-2800 или 2800-3000 мг) офатумумаба. В воплощениях офатумумаб вводят в начальной дозировке примерно 300 мг, затем 2000 мг, например, примерно 11 доз, например, в течение 24 недель. В некоторых воплощениях офатумумаб вводят с интервалом между дозами в по меньшей мере 4 дня, например, 4, 7, 14, 21, 28, 35 дней или больше. Например, офатумумаб вводят

с интервалом между дозами в по меньшей мере 1 неделю, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24, 26, 28, 20, 22, 24, 26, 28, 30 недель или больше. В некоторых воплощениях офатумумаб вводят в дозе и интервалом между дозами, описанными в настоящем описании, в течение периода времени, например, по меньшей мере 1 неделю, например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 50, 60 недель или дольше, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 месяцев или дольше, или 1, 2, 3, 4, 5 лет или дольше. Например, офатумумаб вводят в дозе и интервалом между дозами, описанными в настоящем описании, в целом по меньшей мере 2 дозы на цикл лечения (например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20 или больше доз на цикл лечения).

В некоторых случаях анти-CD20 антитело включает окрелизумаб. Окрелизумаб представляет собой гуманизированное анти-CD20 моноклональное антитело, например, описанное в идентификаторе клинического испытания №№ NCT00077870, NCT01412333, NCT00779220, NCT00673920, NCT01194570, и в Karpos et al., *Lancet*, 19.378(2011): 1779-87.

В некоторых случаях анти-CD20 антитело включает велтузумаб. Велтузумаб представляет собой гуманизированное моноклональное антитело против CD20. См., например, идентификатор клинического испытания №№ NCT00547066, NCT00546793, NCT01101581, и Goldenberg et al., *Leuk. Lymphoma*, 51(5)(2010): 747-55.

В некоторых случаях анти-CD20 антитело включает GA101. GA101 (также называемый обинутузумабом или RO5072759) представляет собой гуманизированное гликоинженерное анти-CD20 моноклональное антитело. См., например, Robak, *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 10.6(2009): 588-96; идентификатор клинического испытания №№ NCT01995669, NCT01889797, NCT02229422 и NCT01414205; и www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/125486s000lbl.pdf.

В некоторых случаях анти-CD20 антитело включает AME-133v. AME-133v (также называемый LY2469298 или окаратузумабом) представляет собой гуманизированное IgG1 моноклональное антитело против CD20 с повышенной аффинностью в отношении рецептора FcγRIIIa, и усиленной антителозависимой клеточной цитотоксической (ADCC) активностью по сравнению с ритуксимабом. См., например, Robak et al., *BioDrugs*, 25.1(2011): 13-25; и Forero-Torres et al., *Clin Cancer Res.*, 18.5(2012): 1395-403.

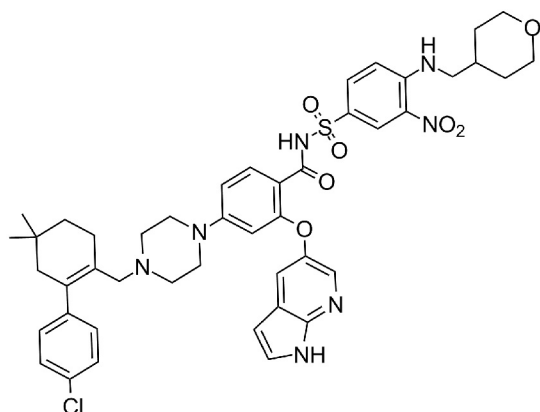
В некоторых случаях анти-CD20 антитело включает PRO131921. PRO131921 представляет собой гуманизированное анти-CD20 моноклональное антитело, сконструированное как имеющее более хорошее связывание с FcγRIIIa и усиленной ADCC по сравнению с ритуксимабом. См., например, Robak et al., *BioDrugs*, 25.1(2011): 13-25; и Casulo et al., *Clin. Immunol.*, 154.1(2014): 37-46; и идентификатор клинического испытания № NCT00452127.

В некоторых случаях анти-CD20 антитело включает TRU-015. TRU-015 представляет собой анти-CD20 слитый белок, полученный из доменов антитела против CD20. TRU-015 меньше, чем моноклональные антитела, но сохраняет Fc-опосредуемые эффекторные функции. См., например, Robak et al., *BioDrugs*, 25.1(2011): 13-25. TRU-015 содержит анти-CD20 одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), соединенный с шарниром человеческого IgG1, доменами CH2 и CH3, но утрачивает домены CH1 и CL.

В некоторых случаях анти-CD20 антитело, описанное в настоящем описании, конъюгировано или иначе связано с терапевтическим средством, например, химиотерапевтическим средством (например, цитоксаном, флударабином, ингибитором гистондеацетилазы, деметилирующим средством, пептидной вакциной, противоопухолевым антибиотиком, ингибитором тирозинкиназы, алкилирующим

агентом, антимикротубулярным средством или антимитотическим средством), противоаллергическим средством, средством от тошноты (или противорвотным средством), средством от боли или цитопротектором, описанными в настоящем описании.

В воплощениях CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с ингибитором В-клеточной лимфомы 2 (BCL-2) (например, венетоклаксом, также называемым АВТ-199 или GDC-0199) и/или ритуксимабом. В воплощениях CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с венетоклаксом и ритуксимабом. Венетоклакс является небольшой молекулой, которая ингибирует антиапоптозный белок BCL-2. Структура венетоклакса (4-(4-{[2-(4-хлорфенил)-4,4-диметилциклогекс-1-ен-1-ил]метил} пиперазин-1-ил)-N-({3-нитро-4-[(тетрагидро-2H-пиран-4-илметил)амино]фенил} сульфонил)-2-(1H-пирроло[2,3-*b*]пиридин-5-илокси)бензамида) показана ниже.



В воплощениях субъект имеет CLL. В воплощениях субъект имеет рецидивный CLL, например, субъект ранее получал противораковую терапию. В воплощениях венетоклаксом вводят в дозировке примерно 15-600 мг (например, 15-20, 20-50, 50-75, 75-100, 100-200, 200-300, 300-400, 400-500 или 500-600 мг), например, ежедневно. В воплощениях ритуксимаб вводят в дозировке примерно 350-550 мг/м² (например, 350-375, 375-400, 400-425, 425-450, 450-475 или 475-500 мг/м²), например, внутривенно, например, ежемесячно.

В некоторых воплощениях CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят в комбинации с онколитическим вирусом. В воплощениях онколитические вирусы способны селективно реплицироваться в и запускать гибель или ослабление роста раковой клетки. В некоторых случаях онколитические вирусы не оказывают действия или минимально действуют на нераковые клетки. Онколитический вирус включает, но не ограничивается перечисленным, онколитический аденовирус, онколитический вирус простого герпеса, онколитический ретровирус, онколитический парвовирус, онколитический вирус коровьей оспы, онколитический вирус Синбис, онколитический вирус гриппа или онколитический РНК-вирус (например, онколитический реовирус, онколитический вирус ньюкаслской болезни (NDV), онколитический вирус кори или онколитический вирус везикулярного стоматита (VSV)).

В некоторых воплощениях онколитический вирус представляет собой вирус, например, рекомбинантный онколитический вирус, описанный в US 2010/0178684 A1, полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки. В некоторых воплощениях рекомбинантный онколитический вирус включает нуклеотидную последовательность (например, гетерологичную нуклеотидную последовательность), кодирующую ингибитор иммунной или воспалительной реакции, например, как описано

в US 2010/0178684 A1, полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки. В воплощениях рекомбинантный онколитический вирус, например, онколитический NDV, включает проапоптозный белок (например, апоптин), цитокин (например, GM-CSF, интерферон-гамма, интерлейкин 2 (IL-2), фактор некроза опухоли альфа), иммуноглобулин (например, антитело против ED-B фибронектина), опухольассоциированный антиген, биспецифический адаптерный белок (например, биспецифическое антитело или фрагмент антитела, направленные против белка NDV HN, и Т-клеточный костимулирующий рецептор, такой как CD3 или CD28; или слитый белок человеческого IL-2 и одноцепочечного антитела, направленного против белка NDV HN). См., например, работу Zamarin et al., *Future Microbiol.*, 7.3(2012): 347-67, полностью включенную в настоящее описание в качестве ссылки. В некоторых воплощениях онколитический вирус представляет собой химерный онколитический NDV, описанный в US 8591881 B2, US 2012/0122185 A1 или US 2014/0271677 A1, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

В некоторых воплощениях онколитический вирус включает условно реплицирующийся аденовирус (CRA_d), который создан для репликации исключительно в раковых клетках. См., например, Alemany et al., *Nature Biotechnol.*, 18 (2000): 732-27. В некоторых воплощениях онколитический аденовирус включает вирус, описанный в таблице 1 на с.725 в работе Alemany et al., полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки.

Примеры онколитических вирусов включают, но не ограничиваются перечисленным, следующее:

онколитический аденовирус группы В (ColoAd1) (PsiOxus Therapeutics Ltd.) (см., например, идентификатор клинического испытания NCT02053220);

ONCOS-102 (называвшийся прежде CGTG-102), который представляет собой аденовирус, включающий гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) (Oncos Therapeutics) (см., например, идентификатор клинического испытания NCT01598129);

VCN-01, который представляет собой генетически модифицированный онколитический аденовирус человека, кодирующий гиалуронидазу PH20 человека (VCN Biosciences, S.L.) (см., например, идентификаторы клинического испытания NCT02045602 и NCT02045589);

условно реплицирующийся аденовирус ICOVIR-5, который представляет собой вирус, полученный из серотипа 5 аденовируса человека (H_{ad}5), который модифицирован для селективной репликации в раковых клетках с разрегулированным путем ретинобластома/E2F (Institut Català d'Oncologia) (см., например, идентификатор клинического испытания NCT01864759);

Celyvir, который включает полученные из костного мозга аутологичные мезинхимальные стволовые клетки (MSC), инфицированные ICOVIR5, онколитический аденовирус (Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain/Ramon Alemany) (см., например, идентификатор клинического испытания NCT01844661);

CG0070, который представляет собой условно реплицирующийся онколитический аденовирус серотипа 5 (Ad5), в котором человеческий промотор E2F-1 управляет экспрессией незаменимых вирусных генов E1a, посредством чего ограничивается репликация вируса и цитотоксичность для опухолевых клеток с дефицитом пути Rb (Cold Genesys, Inc.) (см., например, идентификатор клинического испытания NCT02143804); или

DNX-2401 (официальное название Delta-24-RGD), который представляет собой

аденовирус, сконструированный для селективной репликации в ретинобластомных клетках с дефицитом пути (Rb) и для инициализации клеток, которые экспрессируют некоторые RGD-связывающие интегрины более эффективно (Clinica Universidad de Navarra, Universidad de Navarra/ DNAtrix, Inc.) (см., например, идентификатор клинического испытания NCT01956734).

В некоторых воплощениях онколитический вирус, описанный в настоящем описании, вводят инъекцией, например, подкожной, интраартериальной, внутривенной, внутримышечной, интратекальной или интраперитонеальной инъекцией. В воплощениях онколитический вирус, описанный в настоящем описании, вводят интратуморально, интрадермально, трансмукозально, перорально, интраназально или путем легочного введения.

В одном воплощении клетки, экспрессирующие CAR, описанный в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с молекулой, которая уменьшает клеточную популяцию Treg. Способы уменьшения числа (например, истощения) клеток Treg известны в технике и включают, например, деплецию CD25, введение циклофосфамида, модуляцию функции GITR. Без желания привязываться к какой-либо теории, полагают, что уменьшение числа клеток Treg у субъекта перед аферезом или перед введением CAR-экспрессирующей клетки, описанной в настоящем описании, снижает число нежелательных иммунных клеток (например, Treg) в окружающей микросреде опухоли и снижает опасность рецидива у субъекта.

В одном воплощении CAR-экспрессирующую клетки, описанную в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с молекулой, таргетирующей GITR и/или модулирующей функции GITR, такой как агонист GITR и/или антитело к GITR, которые истощают регуляторные Т-клетки (Treg). В воплощениях клетки, экспрессирующие CAR, описанный в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с циклофосфамидом. В одном воплощении GITR-связывающие молекулы и/или молекулы, модулирующие функции GITR (например, агонист GITR и/или антитела к GITR, истощающие Treg) вводят перед введением CAR-экспрессирующей клетки. Например, в одном воплощении агонист GITR можно ввести до афереза клеток. В воплощениях циклофосфамид вводят субъекту перед введением (например, инфузии или реинфузии) CAR-экспрессирующей клетки или перед аферезом клеток. В воплощениях циклофосфамид и анти-GITR антитело вводят субъекту перед введением (например, инфузии или реинфузии) CAR-экспрессирующей клетки или перед аферезом клеток. В одном воплощении субъект имеет рак (например, солидный рак или гемптологический рак, такой как ALL или CLL). В одном воплощении субъект имеет CLL. В воплощениях субъект имеет ALL. В воплощениях субъект имеет солидный рак, например, солидный рак, описанный в настоящем описании. Примеры агонистов GITR включают, например, слитые белки GITR и анти-GITR антител (например, двухвалентных анти-GITR антител), такие как, например, слитый белок GITR, описанный в патенте США № 6111090, европейском патенте № 090505B1, патенте США № 8586023, публикациях PCT №№ WO 2010/003118 и 2011/090754, или anti-GITR антитело, описанное, например, в патенте США № 7025962, европейском патенте № 1947183B1, патенте США № 7812135, патенте США № 8388967, патенте США № 8591886, европейском патенте № EP 1866339, публикации PCT № WO 2011/028683, публикации PCT № WO 2013/039954, публикации PCT WO2005/007190, публикации PCT № WO 2007/133822, публикации PCT № WO2005/055808, публикации PCT № WO 99/40196, публикации PCT № WO 2001/03720, публикации PCT № WO99/20758, публикации PCT № WO2006/083289, публикации PCT № WO 2005/115451, патенте США № 7618632 и публикации PCT № WO 2011/051726.

В одном воплощении CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с ингибитором mTOR, например, ингибитором mTOR, описанным в настоящем описании, например, рапалогом, таким как эверолимус. В одном воплощении ингибитор mTOR вводят перед введением CAR-экспрессирующей клетки. Например, в одном воплощении ингибитор mTOR можно ввести перед аферезом клеток.

В одном воплощении CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с агонистом G1TR, например, агонистом G1TR, описанным в настоящем описании. В одном воплощении агонист G1TR вводят перед введением CAR-экспрессирующей клетки. Например, в одном воплощении агонист G1TR вводят перед аферезом клеток.

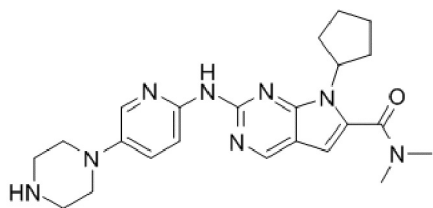
В одном воплощении CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с ингибитором протеинтирозинфосфатазы, например, ингибитором протеинтирозинфосфатазы, описанным в настоящем описании. В одном воплощении ингибитор протеинтирозинфосфатазы представляет собой ингибитор SHP-1, например, ингибитор SHP-1, описанный в настоящем описании, такой как, например, стибоглюконат натрия. В одном воплощении ингибитор протеинтирозинфосфатазы представляет собой ингибитор SHP-2, например, ингибитор SHP-2, описанный в настоящем описании.

В одном воплощении CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, можно использовать в комбинации с ингибитором киназы. В одном воплощении ингибитором киназы является ингибитор CDK4, например, ингибитор CDK4, описанный в настоящем описании, такой как, например, ингибитор CDK4/6, такой как, например, гидрохлорид 6-ацетил-8-циклопентил-5-метил-2-(5-пиперазин-1-илпиридин-2-иламино)-8*H*-пиридо[2,3-*d*]пиримидин-7-она (также называемый палбоциклибом или PD0332991). В одном воплощении ингибитором киназы является ингибитор ВТК, например, ингибитор ВТК, описанный в настоящем описании, такой как, например, ибрутиниб. В одном воплощении ингибитором киназы является ингибитор mTOR, например, ингибитор mTOR, описанный в настоящем описании, такой как, например, рапамицин, аналог рапамицина, OSI-027. Ингибитор mTOR может представлять собой, например, ингибитор TORC1 и/или ингибитор TORC2, например, ингибитор TORC1 и/или ингибитор TORC2, описанный в настоящем описании. В одном воплощении ингибитором киназы является ингибитор MNK, например, ингибитор MNK, описанный в настоящем описании, такой как, например, 4-амино-5-(4-фторанилино)-пиразоло[3,4-*d*]пиримидин. Ингибитор MNK может представлять собой, например, ингибитор MNK1a, MNK1b, MNK2a и/или MNK2b. В одном воплощении ингибитором киназы является двойной ингибитор PI3K/mTOR, описанный в настоящем описании, такой как, например, PF-04695102. В одном воплощении ингибитором киназы является ингибитор DGK, например, ингибитор DGK, описанный в настоящем описании, такой как, например, DGKinh1 (D5919) или DGKinh2 (D5794). В одном воплощении ингибитором киназы является ингибитор CDK4, выбранный из алоизина А; флавопиридола или HMR-1275, 2-(2-хлорфенил)-5,7-дигидрокси-8-[(3*S*,4*R*)-3-гидрокси-1-метил-4-пиперидинил]-4-хроменона; кризотиниба (PF-02341066; гидрохлорида 2-(2-хлорфени)-5,7-дигидрокси-8-[(2*R*,3*S*)-2-(гидроксиметил)-1-метил-3-пирролидинил]-4*H*-1-бензопиран-4-она (P276-00); 1-метил-5-[[2-[5-(трифторметил)-1*H*-имидазол-2-ил]-4-пиридинил]окси]-*N*-[4-(трифторметил)фенил]-1*H*-бензимидазол-2-амин (RAF265); индисулама (E7070); росковитина (CYC202); паллооциклиба (PD0332991); динациклиба (SCH727965); *N*-[5-[(5-*трет*-бутилоксазол-2-ил)метил]тио]тиазол-2-ил]пиперидин-4-

карбоксамида (BMS 387032); 4-[[9-хлор-7-(2,6-дифторфенил)-5*H*-пиримидо[5,4-*d*][2] бензазипин-2-ил]амино]бензойной кислоты (MLN8054); 5-[3-(4,6-дифтор-1*H*-бензимидазол-2-ил)-1*H*-индазол-5-ил]-*N*-этил-4-метил-3-пиридинметанамина (AG-024322); *N*-(пиперидин-4-ил)амида 4-(2,6-дихлорбензоиламино)-1*H*-пиразол-3-карбоновой кислоты (AT7519); 4-[2-метил-1-(1-метилэтил)-1*H*-имидазол-5-ил]-*N*-[4-(метилсульфонил) фенил]-2-пиридинамина (AZD5438) и XL281 (BMS908662).

В одном воплощении ингибитором киназы является ингибитор CDK4, например, палбоциклиб (PD0333991), и палбоциклиб вводят в дозе примерно 50 мг, 60 мг, 70 мг, 75 мг, 80 мг, 90 мг, 100 мг, 105 мг, 110 мг, 115 мг, 120 мг, 125 мг, 130 мг, 135 мг (например, 75 мг, 100 мг или 125 мг) ежедневно в течение периода времени, например, ежедневно в течение 14-21 дня 28-дневного цикла или ежедневно в течение 7-12 дней 21-дневного цикла. В одном воплощении вводят 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или больше циклов палбоциклиба.

В воплощениях CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с ингибитором циклинзависимой киназы (CDK) 4 или 6, например, ингибитором CDK4 или ингибитором CDK6, описанным в настоящем описании. В воплощениях CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с ингибитором CDK4/6 (например, ингибитором, который таргетирует как CDK4, так и CDK6), например, ингибитором CDK4/6, описанным в настоящем описании. В одном воплощении субъект имеет MCL. MCL представляет собой агрессивный рак, который плохо реагирует на терапии, доступные в настоящее время, т.е., по существу неизлечимый. Во многих случаях MCL экспрессируется циклин D1 (регулятор CDK4/6) (например, из-за хромосомальной транслокации, включающей гены иммуноглобулина и циклина D1) в клетках MCL. Таким образом, без связи с теорией, полагают, что клетки MCL весьма чувствительны к ингибированию CDK4/6 с высокой специфичностью (т.е., минимальным воздействием на здоровые иммунные клетки). Ингибиторы CDK4/6 одни имеют некоторую эффективность при лечении MCL, но достигается только частичная ремиссия с высокой степенью рецидива. Примером ингибитора CDK4/6 является LEE011 (также называемый рибоциклибом), структура которого показана ниже.

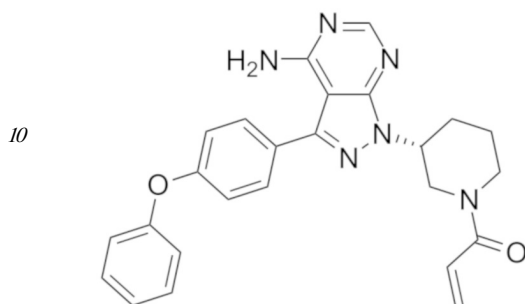


Без связи с теорией, полагают, что введением CAR-экспрессирующей клетки, описанной в настоящем описании, с ингибитором CDK4/6 (например, LEE011 или другим ингибитором CDK4/6, описанным в настоящем описании) можно достигнуть более высокой восприимчивости, например, более высоких степеней ремиссии и/или меньших степеней рецидива, например, по сравнению с одним ингибитором CDK4/6.

В одном воплощении ингибитором киназы является ингибитор ВТК, выбранный из ибрутиниба (PCI-32765); GDC-0834; RN-486; CGI-560; CGI-1764; HM-71224; CC-292; ONO-4059; CNX-774 и LFM-A13. В предпочтительном воплощении ингибитор ВТК не снижает или не ингибирует киназную активность киназы, индуцируемой интерлейкином-2 (ИТК), и выбран из GDC-0834; RN-486; CGI-560; CGI-1764; HM-71224; CC-292; ONO-4059; CNX-774 и LFM-A13.

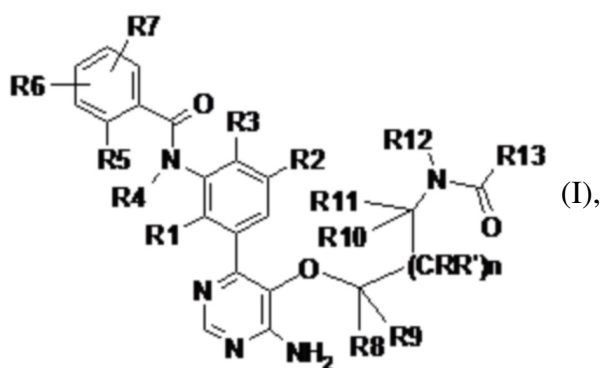
В одном воплощении ингибитором киназы является ингибитор ВТК, например,

ибрутиниб (PCI-32765). В одном воплощении CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с ингибитором ВТК (например, ибрутинибом). В воплощениях CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с ибрутинибом (также называемым PCI-32765).
 5 Структура ибрутиниба ((1-[(3R)-3-[4-амино-3-(4-феноксифенил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пиперидин-1-ил]проп-2-ен-1-она) показана ниже.



В воплощениях субъект имеет CLL, лимфому из клеток мантии (MCL) или лимфому из малых лимфоцитов (SLL). Например, субъект имеет делецию в коротком плече хромосомы 17 (del(17p), например, в лейкозной клетке). В других примерах субъект не имеет del(17p). В воплощениях субъект имеет рецидивную CLL или SLL, например, субъекту ранее назначали противораковую терапию (например, ранее назначали одну, две, три или четыре терапии). В воплощениях субъект имеет рефрактерную CLL или SL. В других воплощениях субъект имеет фолликулярную лимфому, например, рецидивную или рефрактерную фолликулярную лимфому. В некоторых воплощениях вводят ибрутиниб в дозировке примерно 300-600 мг/день (например, примерно 300-350, 350-400, 400-450, 450-500, 500-550 или 550-600 мг/день, например, примерно 420 мг/день или примерно 5 мг/день), например, перорально. В воплощениях ибрутиниб вводят в дозе примерно 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 420 мг, 440 мг, 460 мг, 480 мг, 500 мг, 520 мг, 540 мг, 560 мг, 580 мг, 600 мг (e.g., 250 мг, 420 мг или 560 мг) ежедневно в течение некоторого периода времени, например, ежедневно в течение 21-дневного цикла или ежедневно в течение 28-дневного цикла. В одном воплощении вводят 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или больше циклов ибрутиниба. В некоторых воплощениях ибрутиниб вводят в комбинации с ритуксимабом. См., например, Burger et al. (2013), Ibrutinib In Combination With Rituximab (iR) Is Well Tolerated and Induces a High Rate Of Durable Remissions In Patients With High-Risk Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): New, Updated Results Of a Phase II Trial In 40 Patients, Abstract 675 presented at 55th ASH Annual Meeting and Exposition, New Orleans, LA 7-10 Dec. Без связи с теорией, полагают, что добавление ибрутиниба усиливает Т-клеточную пролиферативную реакцию и может сдвинуть фенотип Т-клеток от Т-хелперных 2 (Th2) к Т-хелперным 1 (Th1). Th1 и Th2 являются фенотипами Т-клеток, причем Th1 и Th2 управляют различными путями иммунной реакции. Фенотип Th1 ассоциируется с провоспалительными реакциями, например, для киллинга клеток, таких как внутриклеточные патогены/вирусы или раковые клетки, или закрепляет аутоиммунные реакции. Фенотип Th2 ассоциируется с накоплением эозинофилов и противовоспалительными реакциями.

В некоторых воплощениях способов, применений и композиций в настоящем описании ингибитор ВТК представляет собой ингибитор ВТК, описанный в международной заявке WO/2015/079417, полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки. Например, в некоторых воплощениях ингибитор ВТК представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль



где в указанной формуле

R1 представляет собой водород, (C1-C6)алкил, необязательно замещенный гидроксигруппой;

R2 представляет собой водород или галоген;

R3 представляет собой водород или галоген;

R4 представляет собой водород;

R5 представляет собой водород или галоген;

или R4 и R5 соединяются друг с другом и обозначают связь, -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -CH=CH-, -CH=CH-CH₂-, -CH₂-CH=CH- или -CH₂-CH₂-CH₂-;

R6 и R7 независимо один от другого обозначают H, (C1-C6)алкил, необязательно замещенный гидроксигруппой, (C3-C6)циклоалкил, необязательно замещенный галогеном или гидроксигруппой, или галоген;

R8, R9, R, R', R10 и R11 независимо один от другого обозначают H или (C1-C6)алкил, необязательно замещенный (C1-C6)алкокси; или любые два из R8, R9, R, R', R10 и R11 вместе с атомом углерода, с которым они связаны, могут образовывать 3-6-членный насыщенный карбоцикл;

R12 представляет собой водород или (C1-C6)алкил, необязательно замещенный галогеном или (C1-C6)алкокси;

или R12 и любой один из R8, R9, R, R', R10 или R11 вместе с атомами, с которыми они связаны, могут образовывать 4-, 5-, 6- или 7-членный азицикл, который необязательно может быть замещен галогеном, циано, гидроксигруппой, (C1-C6)алкилом или (C1-C6)алкокси;

n равен 0 или 1; и

R13 представляет собой (C2-C6)алкенил, необязательно замещенный (C1-C6)алкилом, (C1-C6)алкокси или N,N-ди(C1-C6)алкиламином; (C2-C6)алкинил, необязательно замещенный (C1-C6)алкилом или (C1-C6)алкокси; или (C2-C6)алкиленилоксид, необязательно замещенный (C1-C6)алкилом.

В некоторых воплощениях ингибитор ВТК формулы I выбран из группы, включающей N-(3-(5-((1-акрилоилазетидин-3-ил)окси)-6-аминопиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамид; (E)-N-(3-(6-амино-5-((1-(бут-2-еноил)азетидин-3-ил)окси)пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамид; N-(3-(6-амино-5-((1-пропиолоилазетидин-3-ил)окси)пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамид; N-(3-(6-амино-5-((1-(бут-2-иноил)азетидин-3-ил)окси)пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамид; N-(3-(5-((1-акрилоилпиперидин-4-ил)окси)-6-аминопиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамид; N-(3-(6-амино-5-(2-(N-метилакриламидо)этокси)пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамид; (E)-N-(3-(6-амино-5-(2-(N-метилбут-2-енамидо)этокси)пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамид; N-(3-(6-амино-5-(2-(N-

метилпропиоламидо)этоксипиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-
2-фторбензамид; (E)-N-(3-(6-амино-5-(2-(4-метокси-N-метилбут-2-енамидо)этокси)
пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамид; N-(3-(6-амино-
5-(2-(N-метилбут-2-инамидо)этокси)пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-
циклопропил-2-фторбензамид; N-(2-((4-амино-6-(3-(4-циклопропил-2-фторбензамидо)-
5-фтор-2-метилфенил)пиримидин-5-ил)окси)этил)-N-метилоксиран-2-карбоксамида; N-
(2-((4-амино-6-(3-(6-циклопропил-8-фтор-1-оксоизохинолин-2(1H)-ил)фенил)пиримидин-
5-ил)окси)этил)-N-метилакриламид; N-(3-(5-(2-акриламидоэтокси)-6-аминопиримидин-
4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамид; N-(3-(6-амино-5-(2-(N-
этилакриламидо)этокси)пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-
фторбензамид; N-(3-(6-амино-5-(2-(N-(2-фторэтил)акриламидо)этокси)пиримидин-4-ил)-
5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамид; N-(3-(5-((1-
акриламидоциклопропил)метокси)-6-аминопиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-
циклопропил-2-фторбензамид; (S)-N-(3-(5-(2-акриламидопропокси)-6-аминопиримидин-
4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамид; (S)-N-(3-(6-амино-5-(2-
(бут-2-инамидо)пропокси)пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-
фторбензамид; (S)-N-(3-(6-амино-5-(2-(N-метилакриламидо)пропокси)пиримидин-4-ил)-
5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамид; (S)-N-(3-(6-амино-5-(2-(N-
метилбут-2-инамидо)пропокси)пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-
2-фторбензамид; N-(3-(6-амино-5-(3-(N-метилакриламидо)пропокси)пиримидин-4-ил)-
5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамид; (S)-N-(3-(5-((1-
акрилоилпирролидин-2-ил)метокси)-6-аминопиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-
4-циклопропил-2-фторбензамид; (S)-N-(3-(6-амино-5-((1-(бут-2-иноил)пирролидин-2-
ил)метокси)пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамид;
(S)-2-(3-(5-((1-акрилоилпирролидин-2-ил)метокси)-6-аминопиримидин-4-ил)-5-фтор-2-
(гидроксиметил)фенил)-6-циклопропил-3,4-дигидроизохинолин-1(2H)-он; N-(2-((4-амино-
6-(3-(6-циклопропил-1-охо-3,4-дигидроизохинолин-2(1H)-ил)-5-фтор-2-(гидроксиметил)
фенил)пиримидин-5-ил)окси)этил)-N-метилакриламид; N-(3-(5-(((2S,4R)-1-акрилоил-4-
метоксипирролидин-2-ил)метокси)-6-аминопиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-
циклопропил-2-фторбензамид; N-(3-(6-амино-5-(((2S,4R)-1-(бут-2-иноил)-4-
метоксипирролидин-2-ил)метокси)пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-
циклопропил-2-фторбензамид; 2-(3-(5-(((2S,4R)-1-акрилоил-4-метоксипирролидин-2-
ил)метокси)-6-аминопиримидин-4-ил)-5-фтор-2-(гидроксиметил)фенил)-6-циклопропил-
3,4-дигидроизохинолин-1(2H)-он; N-(3-(5-(((2S,4S)-1-акрилоил-4-метоксипирролидин-
2-ил)метокси)-6-аминопиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-
фторбензамид; N-(3-(6-амино-5-(((2S,4S)-1-(бут-2-иноил)-4-метоксипирролидин-2-ил)
метокси)пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамид; N-
(3-(5-(((2S,4R)-1-акрилоил-4-фторпирролидин-2-ил)метокси)-6-аминопиримидин-4-ил)-
5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамид; N-(3-(6-амино-5-(((2S,4R)-1-
(бут-2-иноил)-4-фторпирролидин-2-ил)метокси)пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-
4-циклопропил-2-фторбензамид; (S)-N-(3-(5-((1-акрилоилазетидин-2-ил)метокси)-6-
аминопиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамид; (S)-N-
(3-(6-амино-5-((1-пропиолоилазетидин-2-ил)метокси)пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-
метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамид; (S)-2-(3-(5-((1-акрилоилазетидин-2-ил)
метокси)-6-аминопиримидин-4-ил)-5-фтор-2-(гидроксиметил)фенил)-6-циклопропил-
3,4-дигидроизохинолин-1(2H)-он; (R)-N-(3-(5-((1-акрилоилазетидин-2-ил)метокси)-6-
аминопиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамид; (R)-N-
(3-(5-((1-акрилоилпиперидин-3-ил)метокси)-6-аминопиримидин-4-ил)-5-фтор-2-

метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамид; N-(3-(5-(((2R,3S)-1-акрилоил-3-метокси-
метоксипирролидин-2-ил)метокси)-6-аминопиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-
циклопропил-2-фторбензамид; N-(3-(5-(((2S,4R)-1-акрилоил-4-цианопирролидин-2-ил)
метокси)-6-аминопиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-
фторбензамид и N-(3-(5-(((2S,4S)-1-акрилоил-4-цианопирролидин-2-ил)метокси)-6-
аминопиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамид.

Если не указано иное, химические термины, использованные выше при описании
ингибитора ВТК формулы I, использованы согласно их значениям, указанным в
международной заявке WO/2015/079417, полностью включенной в настоящее описание
в качестве ссылки.

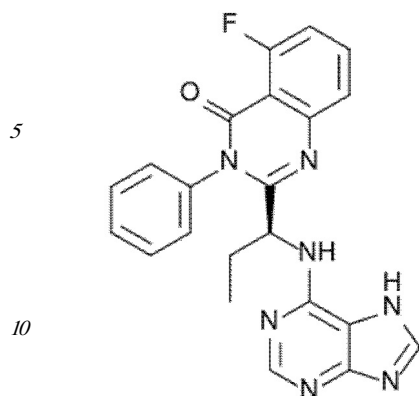
В одном воплощении ингибитор киназы представляет собой ингибитор mTOR,
выбранный из темсиролимуса, ридафоролимуса, (1R,2R,4S)-4-[(2R)-2-
[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R, 23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-дигидрокси-19,30-
диметокси-15,17,21,23,29,35-гексааметил-2,3,10,14,20-пентаоксо-11,36-диокса-4-
азатрицикло[30.3.1.0^{4,9}]гексатриаконта-16,24,26,28-тетраен-12-ил]пропил]-2-
метоксициклогексилдиметилфосфината, также известного как AP23573 и MK8669;
эверолимуса (RAD001); рапамицина (AY22989); симапимода; (5-{2,4-бис[(3S)-3-
метилморфолин-4-ил]пиридо[2,3-d]пиримидин-7-ил}-2-метоксифенил)метанола
(AZD8055); 2-амино-8-[транс-4-(2-гидроксиэтокси)циклогексил]-6-(6-метокси-3-
пиридинил)-4-метилпиридо[2,3-d]пиримидин-7(8H)-она (PF04691502) и N²-[1,4-диоксо-
4-[[4-(4-оксо-8-фенил-4H-1-бензопиран-2-ил)морфолиний-4-ил]метокси]бутил]-L-
аргинилглицил-L-α-аспартил-L-серина (SEQ ID NO: 313), внутренней соли (SF1126) и
XL765.

В одном воплощении ингибитор киназы представляет собой ингибитор mTOR,
например, рапамицин, и рапамицин вводят в дозе примерно 3 мг, 4 мг, 5 мг, 6 мг, 7 мг,
8 мг, 9 мг, 10 мг (например, 6 мг) ежедневно в течение некоторого периода времени,
например, ежедневно в течение 21-дневного цикла или ежедневно в течение 28-дневного
цикла. В одном воплощении вводят 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или больше циклов
рапамицина. В одном воплощении ингибитор киназы представляет собой ингибитор
mTOR, например, эверолимус, и эверолимус вводят в дозе примерно 2 мг, 2.5 мг, 3 мг,
4 мг, 5 мг, 6 мг, 7 мг, 8 мг, 9 мг, 10 мг, 11 мг, 12 мг, 13 мг, 14 мг, 15 мг (например, 10 мг)
ежедневно в течение некоторого периода времени, например, ежедневно в течение 28-
дневного цикла. В одном воплощении вводят 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или больше
циклов эверолимуса.

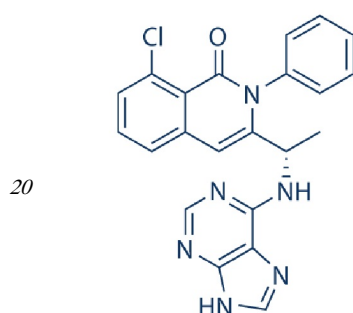
В одном воплощении ингибитор киназы представляет собой ингибитор MNK,
выбранный из CGP052088; 4-амино-3-(п-фторфениламино)пиразоло[3,4-d]пиримидина
(CGP57380); церкоспорамида; ETC-1780445-2 и 4-амино-5-(4-фторанилино)пиразоло
[3,4-d]пиримидина.

В воплощениях CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании,
вводят субъекту в комбинации с ингибитором фосфоинозитид-3-киназы (P13K)
(например, ингибитором P13K, описанным в настоящем описании, например,
иделалисибом или дувелисибом) и/или ритуксимабом. В воплощениях CAR-
экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят субъекту в
комбинации с иделалисибом и ритуксимабом. В воплощениях CAR-экспрессирующую
клетку, описанную в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с дувелисибом
и ритуксимабом. Иделалисиб (также называемый GS-1101 или CAL-101; Gilead)
представляет собой малую молекулу, которая блокирует дельта-изоформу P13K.
Структура иделалисиба (5-фтор-3-фенил-2-[(1S)-1-(7H-пурин-6-иламино)пропил]-4(3H)-

хиназолинона) показана ниже.



Дувелисиб (также называемый IPI-145; Infinity Pharmaceuticals and Abbvie) представляет собой малую молекулу, которая блокирует PI3K- δ , γ . Структура дувелисиба (8-хлор-2-фенил-3-[(1S)-1-(9H-пурин-6-иламино)этил]-1(2H)изохинолинона) показана ниже.



В воплощениях субъект имеет CLL. В воплощениях субъект имеет рецидивный CLL, например, субъекту ранее назначали противораковую терапию (например, ранее вводили анти-CD20 антитела или ранее вводили ибрутиниб). Например, субъект имеет делецию в коротком плече хромосомы 17 (del(17p), например, в лейкозной клетке). В других примерах субъект не имеет del(17p). В воплощениях у субъекта имеется лейкозная клетка, включающая мутацию в гене варибельного участка тяжелой цепи иммуноглобулина (*IgV_H*). В других воплощениях у субъекта не имеется лейкозной клетки, включающей мутацию в гене варибельного участка тяжелой цепи иммуноглобулина (*IgV_H*). В воплощениях субъект имеет делецию в длинном плече хромосомы 11 (del(11q)). В других воплощениях субъект не имеет del(11q). В воплощениях иделалисиб вводят в дозировке примерно 100-400 мг (например, 100-125, 125-150, 150-175, 175-200, 200-225, 225-250, 250-275, 275-300, 325-350, 350-375 или 375-400 мг), например, BID. В воплощениях дувелисиб вводят в дозировке примерно 15-100 мг (например, примерно 15-25, 25-50, 50-75 или 75-100 мг), например, дважды в день. В воплощениях ритуксимаб вводят в дозировке примерно 350-550 мг/м² (например, примерно 350-375, 375-400, 400-425, 425-450, 450-475 или 475-500 мг/м²), например, внутривенно.

В одном воплощении ингибитор киназы представляет собой двойной ингибитор фосфатидилинозит-3-киназы (PI3K) и mTOR, выбранный из 2-амино-8-[транс-4-(2-гидроксиэтокси)циклогексил]-6-(6-метокси-3-пиридирил)-4-метилпиридо[2,3-d]пиримидин-7(8H)-она (PF-04691502); N-[4-[[4-(диметиламино)-1-пиперидинил]карбонил]фенил]-N'-[4-(4,6-ди-4-морфолинил-1,3,5-триазин-2-ил)фенил]мочевины (PF-05212384, PKI-587); 2-метил-2-{4-[3-метил-2-оксо-8-(хинолин-3-ил)-2,3-дигидро-1H-имидазо[4,5-c]хинолин-1-ил]фенил}пропаннитрила (BEZ-235); апитолисиба (GDC-0980, RG7422);

2,4-дифтор-N-{2-(метилокси)-5-[4-(4-пиридазинил)-6-хинолинил]-3-пиридирил} бензолсульфонамида (GSK2126458); 8-(6-метоксипиридин-3-ил)-3-метил-1-(4-(пиперазин-1-ил)-3-(трифторметил)фенил)-1H-имидазо[4,5-с]хинолин-2(3H)-он-малеиновой кислоты (NVP-BGT226); 3-[4-(4-морфолинилпиридо[3',2':4,5]фуоро[3,2-d]пиримидин-2-ил)фенола (PI-103); 5-(9-изопропил-8-метил-2-морфолино-9H-пурин-6-ил)пиримидин-2-амин (VS-5584, SB2343) и N-[2-[(3,5-диметоксифенил)амино]хиноксалин-3-ил]-4-[(4-метил-3-метоксифенил)карбонил]аминофенилсульфонамида (XL765).

В воплощениях CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с ингибитором киназы анапластической лимфомы (ALK).

Примеры киназ ALK включают, но не ограничиваются перечисленным, кризотиниб (Pfizer), церитиниб (Novartis), алектиниб (Chugai), бригагиниб (также называемый AP26113; Ariad), энтректиниб (Ignyta), PF-06463922 (Pfizer), TSR-011 (Tesar) (см., например, идентификатор клинического испытания № NCT02048488), CEP-37440 (Teva) и X-396 (Xcovery). В некоторых воплощениях субъект имеет солидный рак, например, солидный рак, описанный в настоящем описании, например, рак легких.

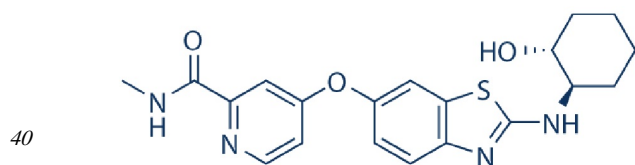
Химическое название кризотиниба 3-[(1R)-1-(2,6-дихлор-3-фторфенил)этокси]-5-(1-пиперидин-4-илпиразол-4-ил)пиридин-2-амин. Химическое название церитиниба 5-хлор-N²-[2-изопропокси-5-метил-4-(4-пиперидинил)фенил]-N⁴-[2-(изопропилсульфонил)фенил]-2,4-пиримидиндиамин. Химическое название алектиниба 9-этил-6,6-диметил-8-(4-морфолинопиперидин-1-ил)-11-оксо-6,11-дигидро-5H-бензо[b]карбазол-3-карбонитрил. Химическое название бригагиниба 5-хлор-N²-{4-[4-(диметиламино)-1-пиперидинил]-2-метоксифенил}-N⁴-[2-(диметилфосфорил)фенил]-2,4-пиримидиндиамин. Химическое название энтректиниба N-(5-(3,5-дифторбензил)-1H-индазол-3-ил)-4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-((тетрагидро-2H-пиран-4-ил)амино)бензамид. Химическое название PF-06463922 (10R)-7-амино-12-фтор-2,10,16-триметил-15-оксо-10,15,16,17-тетрагидро-2H-8,4-(метено)пиразоло[4,3-h][2,5,11]бензоксадиазациклотетрадецин-3-карбонитрил. Химическая структура CEP-37440 (S)-2-((5-хлор-2-((6-(4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил)-1-метокси-6,7,8,9-тетрагидро-5H-бензо[7]аннулен-2-ил)амино)пиримидин-4-ил)амино)-N-метилбензамид. Химическое название X-396 (R)-6-амино-5-(1-(2,6-дихлор-3-фторфенил)этокси)-N-(4-(4-метилпиперазин-1-карбонил)фенил)пиридазин-3-карбоксамид.

Также можно использовать лекарственные средства, которые ингибируют или кальцийзависимую фосфатазу кальцинеурин (циклоспорин и FK506) или киназу p70S6, что важно для передачи сигнала, вызванного фактором роста (рапамицин) (Liu *et al.*, Cell, 66: 807-815, 1991; Henderson *et al.*, Immun., 73: 316-321, 1991; Bierer *et al.*, Curr. Opin. Immun., 5: 763-773, 1993). В другом аспекте композиции клеток по настоящему изобретению можно вводить пациенту в сочетании с (например, до, одновременно или после) трансплантацией костного мозга, Т-клеточной аблативной терапией с использованием химиотерапевтических средств, таких как флударабин, наружной лучевой терапии (XRT), циклофосфида и/или антител, таких как ОКТ3 или САМРАТН. В одном аспекте композиции клеток по настоящему изобретению вводят после В-клеточной аблативной терапии, такой как средства, которые реагируют с CD20, например, ритуксаном. Например, в одном воплощении субъекты могут подвергаться стандартному лечению с высокой дозой химиотерапии с последующей трансплантацией стволовых клеток периферической крови. В некоторых воплощениях после трансплантации субъекты получают инфузию размноженных иммунных клеток по настоящему изобретению. В другом воплощении размноженные клетки вводят до

последующей операции.

В воплощениях CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с ингибитором индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO). IDO представляет собой фермент, который катализирует разрушение аминокислоты L-триптофана до кинуренина. При многих раковых заболеваниях сверхэкспрессируются IDO, например, при раке предстательной железы, колоректальном раке, раке поджелудочной железы, цервикальном раке, раке желудка, яичников, головы и легких. Экспрессировать IDO могут pDC, макрофаги и дендритные клетки (DC). Без связи с теорией, полагают, что уменьшение количества L-триптофана (например, катализируемое IDO) приводит к иммуносупрессивной среде путем индукции Т-клеточных анергии и апоптоза. Таким образом, без связи с теорией, полагают, что ингибитор IDO может усилить эффективность CAR-экспрессирующей клетки, описанной в настоящем описании, например, путем снижения супрессии или гибели CAR-экспрессирующей иммунной клетки. В воплощениях субъект имеет солидный рак, например, солидный рак, описанный в настоящем описании, например, рак предстательной железы, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, цервикальный рак, рак желудка, яичников, головы и легких. Примеры ингибиторов IDO включают, но не ограничиваются перечисленным, 1-метилтриптофан, индоксимод (NewLink Genetics) (см., например, идентификатор клинического испытания №№ NCT01191216; NCT01792050) и INCB024360 (Incyte Corp.) (см., например, идентификатор клинического испытания №№ NCT01604889; NCT01685255).

В воплощениях CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с модулятором супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSC). MDSC накапливаются на периферии и в месте опухоли многих солидных опухолей. Такие клетки подавляют Т-клеточные реакции, посредством чего мешают эффективности терапии CAR-экспрессирующими клетками. Без связи с теорией, полагают, что введение модулятора MDSC повышает эффективность CAR-экспрессирующей клетки, описанной в настоящем описании. В одном воплощении субъект имеет солидный рак, например, солидный рак, описанный в настоящем описании, например, глиобластома. Примеры модуляторов MDSC включают, но не ограничиваются перечисленным, MCS110 и BLZ945. MCS110 представляет собой моноклональное антитело (mAb) против макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF). См., например, идентификатор клинического испытания № NCT00757757. BLZ945 представляет собой низкомолекулярный ингибитор рецептора колониестимулирующего фактора 1 (CSF1R). См., например, Pyonteck et al., Nat. Med., 19 (2013): 1264-72. Структура BLZ945 показана ниже.



В воплощениях CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с CD19-CART клеткой (например, CTL019, например, как описано в WO2012/079000, включенной в настоящее описание в качестве ссылки). В воплощениях субъект имеет острый миелоидный лейкоз (AML), например, CD19-положительный AML или CD19-отрицательный AML. В воплощениях субъект имеет CD19+ лимфому, например, CD19+ неходжкинскую лимфому (NHL), CD19+ FL или CD19+ DLBCL. В воплощениях субъект имеет рецидивную или рефрактерную CD19+ лимфому. В воплощениях субъекту назначают противолимфомную (lymphodepleting)

терапию до, одновременно или после введения (например, инфузии) CD19-CART клеток. В одном примере противолимфомную терапию субъекту назначают перед введением CD19-CART клеток. Например, противолимфомная терапия заканчивается за 1-4 дня (например, 1, 2, 3 или 4 дня) до инфузии CD19-CART клеток. В воплощениях вводят несколько доз CD19-CART клеток, например, как описано в настоящем описании.

Например, одна доза включает примерно 5×10^8 CD19-CART клеток. В воплощениях противолимфомную терапию субъекту назначают до, одновременно или после введения (например, инфузии) CAR-экспрессирующей клетки, описанной в настоящем описании, например, не-CD19-CAR-экспрессирующей клетки. В воплощениях CD19-CART вводят до, одновременно или после введения (например, инфузии) не-CD19-CAR-экспрессирующей клетки, например, не-CD19-CAR-экспрессирующей клетки, описанной в настоящем описании.

В некоторых воплощениях CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с CD19-CAR-экспрессирующей клеткой, например, CTL019, как описано в WO2012/079000, включенной в настоящее описание в качестве ссылки, для лечения заболевания, связанного с экспрессией CLL-1, например, рака, описанного в настоящем описании. Без связи с теорией, полагают, что введение CD19-CAR-экспрессирующей клетки в комбинации с CAR-экспрессирующей клеткой улучшает эффективность CAR-экспрессирующей клетки, описанной в настоящем описании, путем таргетинга ранней линии раковых клеток, например, раковых стволовых клеток, модуляции иммунной реакции, истощения регуляторных В-клеток и/или улучшения окружающей микросреды опухоли. Например, CD19-CAR-экспрессирующая клетка таргетирует раковые клетки, которые экспрессируют маркеры ранней клеточной линии, например, раковых стволовых клеток, и CD19-экспрессирующие клетки, в то время как CAR-экспрессирующая клетки, описанная в настоящем описании, таргетирует раковые клетки, которые экспрессируют маркеры поздней клеточной линии, например, CLL-1. Такой обусловленный подход может улучшить эффективность CAR-экспрессирующей клетки, описанной в настоящем описании. В таких воплощениях CD19-CAR-экспрессирующую клетку вводят до, одновременно или после введения (например, инфузии) CAR-экспрессирующей клетки, описанной в настоящем описании.

В воплощениях CAR-экспрессирующая клетка, описанная в настоящем описании, также экспрессирует CAR, таргетирующий CD19, например, CD19-CAR. В одном воплощении клетку, экспрессирующую CAR, описанную в настоящем описании, и CD19-CAR вводят субъекту для лечения рака, описанного в настоящем описании, например, AML. В одном воплощении конфигурации одной или обеих молекул CAR включает первичный внутриклеточный сигнальный домен и костимулирующий сигнальный домен. В одном воплощении конфигурации одной или обеих молекул CAR включает первичный внутриклеточный сигнальный домен и 2, 3, 4 или 5 или больше костимулирующих сигнальных доменов. В таких воплощениях молекула CAR, описанная в настоящем описании, и CD19-CAR могут иметь одинаковые или различные первичные внутриклеточные сигнальные домены, одинаковые или различные костимулирующие сигнальные домены или одинаковое число или различное число костимулирующих сигнальных доменов. С другой стороны, CAR, описанный в настоящем описании, и CD19-CAR сформированы как расщепленный CAR, в котором одна или больше молекул CAR включают антигенсвязывающий домен и костимулирующий домен (например, 4-1BB), в то время как другая молекула CAR включает антигенсвязывающий домен и первичный внутриклеточный сигнальный домен (например, CD3-дзета).

В некоторых воплощениях CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с полипептидом интерлейкином-15 (IL-15), полипептидом рецептором альфа интерлейкина-15 (IL-15Ra) или комбинацией как полипептида IL-15, так и полипептида IL-15Ra, например, hetIL-15 (Admune Therapeutics, LLC). hetIL-15 представляет собой гетеродимерный ковалентный комплекс IL-15 и IL-15Ra. hetIL-15 описан, например, в U.S. 8124084, U.S. 2012/0177598, U.S. 2009/0082299, U.S. 2012/0141413 и U.S. 2011/0081311, включенных в настоящее описание в качестве ссылок. В воплощениях het-IL-15 вводят подкожно. В воплощениях субъект имеет рак, например, солидный рак, например, меланому или рак толстой кишки. В воплощениях субъект имеет метастазирующий рак.

В воплощениях субъекту, имеющему заболевание, описанное в настоящем описании, например, гематологическое расстройство, например, AML или MDS, вводят CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, в комбинации со средством, например, цитотоксическим или химиотерапевтическим средством, биологической терапией (например, терапией антителами, например, моноклональными антителами, или клеточной терапией) или ингибитором (например, ингибитором киназы). В воплощениях субъекту вводят CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, в комбинации с цитотоксическим средством, например, CPX-351 (Celator Pharmaceuticals), цитарабином, даунорубицином, возароксином (Sunesis Pharmaceuticals), сапацитабином (Cyclacel Pharmaceuticals), идарубицином или митоксантроном. CPX-351 представляет собой липосомальный препарат, включающий цитарабин и даунорубин в молярном соотношении 5:1. В воплощениях субъекту вводят CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, в комбинации с гипометилирующим средством, например, ингибитором ДНК-метилтрансферазы, например, азацитидином или децитабином. В воплощениях субъекту вводят CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, в комбинации с биологической терапией, например, терапией антителами или клеточной терапией, например, 225Ac-линтузумабом (актимаб-A; Actinium Pharmaceuticals), IPH2102 (Innate Pharma/Bristol Myers Squibb), SGN-CD33A (Seattle Genetics) или гемтузумабом озогамицином (Mylotarg; Pfizer). SGN-CD33A представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), включающий димер пирролобензодиазепина, который присоединен к анти-CD33 антителу. Актимаб-A представляет собой анти-CD33 антитело (линтузумаб), меченное актинием. IPH2102 представляет собой моноклональное антитело, которое таргетирует киллерные иммуноглобулиноподобные рецепторы (KIR). В воплощениях субъекту вводят CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, в комбинации с ингибитором FLT3, например, сорафенибом (Bayer), мидостаурином (Novartis), квизартинибом (Daiichi Sankyo), креноланибом (Arog Pharmaceuticals), PLX3397 (Daiichi Sankyo), AKN-028 (Akinion Pharmaceuticals) или ASP2215 (Astellas). В воплощениях субъекту вводят CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, в комбинации с ингибитором изоцитратдегидрогеназы (IDH), например, AG-221 (Celgene/Agios) или AG-120 (Agios/Celgene). В воплощениях субъекту вводят CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, в комбинации с регулятором клеточного цикла, например, ингибитором полоподобной киназы 1 (Plk1), например, воласертибом (Boehringer Ingelheim); или ингибитором циклинзависимой киназы 9 (Cdk9), например, алвоцидибом (Tolero Pharmaceuticals/Sanofi Aventis). В воплощениях субъекту вводят CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, в комбинации с ингибитором сигнальной сети В-клеточного рецептора, например, ингибитором В-клеточной лимфомы 2 (Bcl-2), например, венетоклаксом

(Abbvie/Roche); или ингибитором тирозинкиназы Брутона (Btk), например, ибрутинибом (Pharmacyclics/Johnson & Johnson Janssen Pharmaceutical). В воплощениях субъекту вводят CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, в комбинации с ингибитором M1 аминопептидазы, например, тозедостатом (CTI BioPharma/Vernalis);
 5 ингибитором гистондеацетилазы (HDAC), например, прациностатом (MEI Pharma); ингибитором поликиназы, например, ригосертибом (Onconova Therapeutics/Baxter/SymBio); или обратным агонистом CXCR4, например, BL-8040 (BioLineRx). В воплощениях субъекту вводят CLL-1-таргетирующую CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, в комбинации с CAR-экспрессирующей клеткой,
 10 которая специфически связывает антиген иной, чем CLL-1, например, CLL, BCMA, CD123, CD19, FLT-3 или фолатный рецептор бета.

В другом воплощении субъект получает инфузию композиций с CLL-1-экспрессирующей клеткой по настоящему изобретению перед трансплантацией клеток, например, трансплантацией аллогенных стволовых клеток. В предпочтительном
 15 воплощении CLL-1-экспрессирующие клетки временно экспрессируют CLL-1-CAR, например, путем электропорации мРНК CLL-1-CAR, посредством чего экспрессия CLL-1 обрывается перед инфузией донорских стволовых клеток, для того, чтобы избежать неудачного приживления трансплантата.

Некоторые пациенты могут испытывать аллергические реакции на соединения по
 20 настоящему изобретению и/или другое(ие) противораковое(ые) средство(а) во время или после введения, поэтому обычно вводят антиаллергические средства для минимизации опасности аллергической реакции. Подходящие антиаллергические средства включают кортикостероиды, такие как дексаметазон (например, декадрон), беклометазон (например, бекловент), гидрокортизон (также известный как кортизон,
 25 гидрокортизона натрийсукцинат, гидрокортизона натрийфосфат и продаваемый под торговыми наименованиями Ala-Cort®, гидрокортизона фосфат, Solu-Cortef®, Hydrocort Acetate® и Lanacor®), преднизон (продаваемый под торговыми наименованиями Delta-Cortel®, орапред®, педиапред® и прелон®), преднизон (продаваемый под торговыми наименованиями делтасон®, Liquid Red®, метикортен® и оразон®), метилпреднизолон
 30 (также известный как 6-метилпреднизолон, метилпреднизолон ацетат, метилпреднизолон натрийсукцинат, продаваемый под торговыми наименованиями дуралон®, медралон®, медрол®, М-преднизол® и солумедрол®); антигистаминные средства, такие как дифенгидрамин (например, бенадрил®), гидроксизин и ципрогептадин; и бронходилататоры, такие как агонисты бета-адренергических
 35 рецепторов, альбутерол (например, провентил®) и тербуталин (Brethine®).

Некоторые пациенты могут испытывать тошноту во время или после введения соединения по настоящему изобретению и/или другого(их) противоракового(ых) средства(средств); поэтому используют противорвотные средства для предупреждения тошноты (верхний отдел желудка) и рвоты. Подходящие противорвотные средства
 40 включают апрепитант (Emend®), ондансетрон (Zofran®), гранисетрон HCl (Kytril®), лоразепам (Ativan®), дексаметазон (Decadron®), прохлорперазин (Compazine®), казопитант (резоник® и Zunriga®) и их комбинации.

Во время периода лечения обычно выписывают лекарственные средства для облегчения боли, чтобы пациенту было комфортнее. Обычно используют традиционные
 45 продаваемые без рецепта анальгетики, такие как тилеол. Однако в случае средней или тяжелой боли также применяют опиоидные анальгетирующие лекарственные средства, такие как гидрокодон/парацетамол или гидрокодон/ацетаминофен (например, викодин®), морфин (например, астраморф® или авинза®), оксидон (например,

оксиконтин® или перкоцет®), оксиморфона гидрохлорид (опана®) и фентанил (например, дюрогезик®).

В попытке защитить здоровые клетки от токсичности лечения и ограничить токсическое действие на органы, как вспомогательную терапию можно использовать цитозащитные средства (такие как нейропротекторы, поглотители свободных радикалов, кардиопротекторы, нейтрализаторы экстравазации антрациклинов, питательные вещества и т.п.). Подходящие цитозащитные средства включают амифостин (этиол®), глутамин, димесну (тавоцепт®), месну (меснекс®), дексразоксан (зинекард® или тотект®), ксалипроден (ксаприла®) и лейковорин (также известный как лейковорин кальций, цитроворум-фактор и фолиновая кислота).

Структуру активных соединений, идентифицированных кодовыми номерами, родовые или торговые наименования можно узнать из текущего издания стандартного краткого руководства «The Merck Index» или из баз данных, например, Patents International (например, IMS World Publications).

Вышеупомянутые соединения, которые можно использовать в комбинации с соединением по настоящему изобретению, можно получать и вводить так, как описано в технике, например, в документах, цитированных выше.

В одном воплощении настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим по меньшей мере одно соединение по настоящему изобретению (например, соединение по настоящему изобретению) или его фармацевтически приемлемую соль вместе с фармацевтически приемлемым носителем, подходящим для введения пациенту человеку или животному, или одни или вместе с другими противораковыми средствами.

В одном воплощении настоящее изобретение относится к способам лечения пациентов людей или животных, страдающих от клеточного пролиферативного заболевания, такого как рак. Настоящее изобретение относится к способам лечения пациента человека или животного, нуждающегося в таком лечении, включающем введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения по настоящему изобретению (например, соединения по настоящему изобретению) или его фармацевтически приемлемой соли или одних или в комбинации с другими противораковыми средствами.

В частности, композиции будут или состояться вместе как комбинация терапевтических средств или вводиться по отдельности.

В комбинированной терапии соединение по настоящему изобретению и другое(ие) противораковое(ые) средство(а) можно вводить совместно, одновременно или последовательно без конкретных пределов по времени, причем такое введение обеспечивает терапевтически эффективные уровни двух соединений в организме пациента.

В предпочтительном воплощении соединение по настоящему изобретению и другое (ие) противораковое(ые) средство(а) обычно вводят последовательно в любом порядке инфузией или перорально. Схема приема может изменяться в зависимости от стадии заболевания, физической формы пациента, профилей безопасности отдельных лекарственных средств и переносимости отдельных лекарственных средств, а также других критериев, хорошо известных штатным врачам и практикующим врачам, вводящим комбинацию. Соединение по настоящему изобретению и другое(ие) противораковое(ые) средство(а) можно вводить порознь друг за другом в пределах минут, часов, дней или даже недель, в зависимости от определенного цикла, используемого для лечения. Кроме того, во время лечебного цикла можно включать введение одного лекарственного средства чаще, чем другого, и в различных дозах на

введение лекарственного средства.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к наборам, которые включают одно или несколько соединений по настоящему изобретению и партнера по комбинации, как раскрыто в настоящем описании. Характерные наборы включают (а) соединение по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль, (b) по меньшей мере одного партнера по комбинации, например, указанного выше, в силу чего такой набор может включать упаковку-вкладыш или другую этикетку, включающую указания по введению.

Соединение по настоящему изобретению также можно использовать преимущественно в комбинации с известными терапевтическими способами, например, введением гормонов или, особенно, излучения. Соединение по настоящему изобретению, в частности, можно использовать в качестве радиосенсибилизатора, в особенности, для лечения опухолей, которые показывают слабую чувствительность к радиотерапии.

В одном воплощении пациенту может быть введено средство, которое снижает или ослабляет побочное действие, связанное с введением CAR-экспрессирующей клетки.

Побочное действие, связанное с введением CAR-экспрессирующей клетки, включает, но не ограничивается перечисленным, CRS и гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (HLH), также называемый синдромом активации макрофагов (MAS). Симптомы CRS включают сильную лихорадку, тошноту, временную гипотензию, гипоксию и т.п. CRS может включать клинические конституциональные признаки и симптомы, такие как лихорадка, усталость, анорексия, миалгии, артралгии, тошнота, рвота и головная боль.

CRS может включать клинические кожные проявления и симптомы, такие как сыпь. CRS может включать клинические желудочнокишечные проявления и симптомы, такие как тошнота, рвота и диарея. CRS может включать клинические респираторные признаки

и симптомы, такие как тахипноэ и гипоксемия. CRS может включать клинические сердечно-сосудистые проявления и симптомы, такие как тахикардия, разброс пульсового давления, гипотензия, повышенный сердечный выброс (ранний) и потенциально уменьшенный сердечный выброс (поздний). CRS может включать клинические признаки и симптомы коагуляции, такие как поднявшийся d-димер, гипофибриногенемия с

кровотечением или без. CRS может включать клинические ренальные признаки и симптомы, такие как азотемия. CRS может включать клинические проявления и симптомы со стороны печени, такие как трансаминалит и гипербилирубинемия. CRS может включать клинические неврологические признаки и симптомы, такие как головная боль, изменения психического состояния, спутанность сознания, делирий, затруднение

в поиске слов или выраженная афазия, галлюцинации, тремор, dysmetria, изменившаяся походка и эпилептические припадки. Соответственно, способы, описанные в настоящем описании, могут включать введение субъекту CAR-экспрессирующей клетки, описанной

в настоящем описании, и дополнительное введение одного или нескольких средств для управления повышенными уровнями растворимого фактора в результате лечения CAR-экспрессирующей клеткой. В одном воплощении растворимым фактором, повышенным у пациента, является один или больше из IFN- γ , TNF α , IL-2 и IL-6. В одном воплощении фактором, повышенным у пациента, является один или больше из IL-1, GM-CSF, IL-10, IL-8, IL-5 и факталькина. Следовательно, средство, вводимое для лечения такого

побочного действия, может представлять собой средство, которое нейтрализует один или несколько таких растворимых факторов. В одном воплощении средство, которое нейтрализует одну или несколько таких растворимых форм, представляет собой антитело или антитело к нему. Примеры таких средств включают, но не ограничиваются

перечисленным, стероид (например, кортикостероид), ингибитор TNF α и ингибитор

IL-6. Примером ингибитора TNF α является молекула анти-TNF α антитела, такая как инфликсимаб, адалимумаб, церолизумаб, пегол и голимумаб. Другими примером ингибитора TNF α является слитый белок, такой как энтанерсепт. Низкомолекулярный ингибитор TNF α включает, но не ограничивается перечисленным, производные ксантина (например, пентоксифиллин) и бупропион. Примером ингибитора IL-6 является молекула анти-IL-6 антитела, такая как токлизумаб (ток), сарилумаб, элсалимомаб, CNTO 328, ALD518/BMS-945429, CNTO 136, CPSI-2364, CDP6038, VX30, ARGX-109, FE301 и FM101. В одном воплощении молекулой анти-IL-6 антитела является токлизумаб. Примером ингибитора на основе IL-1R является анакинра.

В одном воплощении пациенту может быть введено средство, которое усиливает активность CAR-экспрессирующей клетки. Например, в одном воплощении средство может представлять собой средство, которое подавляет ингибирующую молекулу, например, средство представляет собой реперный ингибитор. Ингибирующие молекулы, например, запрограммированной гибели 1 (PD1), могут в некоторых воплощениях снижать способность CAR-экспрессирующей клетки готовить иммунную эффекторную реакцию. Примеры ингибирующих молекул включают PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, ГКГС класса I, ГКГС класса II, GAL9, аденозин и TGFR-бета.

Подавление ингибирующей молекулы, например, путем ингибирования ДНК, РНК или уровня белка, может оптимизировать производительность CAR-экспрессирующей клетки. В воплощениях для ингибирования экспрессии ингибирующей молекулы в CAR-экспрессирующей клетке можно использовать ингибирующую нуклеиновую кислоту, например, ингибирующую нуклеиновую кислоту, например, дцРНК, например, мРНК или shРНК. В одном воплощении ингибитор представляет собой shРНК. В одном воплощении ингибирующую молекулу ингибируют в CAR-экспрессирующей клетке. В таких воплощениях молекула дцРНК, которая ингибирует экспрессию ингибирующей молекулы, соединяется с нуклеиновой кислотой, которая кодирует компонент, например, все компоненты, CAR.

В одном воплощении молекула нуклеиновой кислотой, которая кодирует молекулу дцРНК, которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует, Т-клеточную функцию, операбельно соединена с промотором, например, промотором, полученным из H1 или U6, так что в CAR-экспрессирующей клетке экспрессируется молекула дцРНК, которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует, Т-клеточную функцию.

См., например, Tiscornia G., «Development of Lentiviral Vectors Expressing siRNA», Chapter 3, in *Gene Transfer: Delivery and Expression of DNA and RNA* (eds. Friedmann and Rossi). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2007; Brummelkamp T.R. *et al.* (2002), *Science*, 296: 550-553; Miyagishi M. *et al.* (2002), *Nat. Biotechnol.*, 19: 497-500. В

одном воплощении молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует молекулу дцРНК, которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует, Т-клеточную функцию, присутствует на том же векторе, например, лентивирусном векторе, который включает молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует компонент, например, все компоненты, CAR. В таком воплощении молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует молекулу дцРНК, которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует, Т-клеточную функцию, располагается на векторе, например, лентивирусном векторе, 5'-или 3'-к нуклеиновой кислоте, которая кодирует компонент, например, все компоненты,

CAR. Молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует молекулу дцРНК, которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует, Т-клеточную функцию, может быть транскрибирована в том же или другом направлении, что и нуклеиновая кислота, которая кодирует компонент, например, все компоненты, CAR. В одном воплощении молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует молекулу дцРНК, которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует, Т-клеточную функцию, присутствует на векторе ином, чем вектор, который включает молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует компонент, например, все компоненты, CAR. В одном воплощении молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует молекулу дцРНК, которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует, Т-клеточную функцию, временно экспрессируется в CAR-экспрессирующей клетке. В одном воплощении молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует молекулу дцРНК, которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует, Т-клеточную функцию, устойчиво интегрирована в геном CAR-экспрессирующей клетки. Фигуры 29А-29Е отображают примеры векторов для экспрессии компонента, например, всех компонентов, CAR с молекулой дцРНК, которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует, Т-клеточную функцию.

Примеры молекул дцРНК, применимых для ингибирования экспрессии молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует, Т-клеточную функцию, где молекула, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует, Т-клеточную функцию, представляет собой PD1, приводятся ниже.

Ниже в таблице 10 приводятся названия агентов PDCD1 (PD1) RNAi (полученных из их позиции в последовательности NM_008798.2 гена мышиноного PDCD1) вместе с SEQ ID NOs: 216-263, представляющими ДНК-последовательность. В таблице представлены как смысловые (S), так и антисмысловые (AS) последовательности, представленные как последовательности 19mer и 21mer. Также отмечается, что позиция (PoS, например, 176) получена из числа позиций в последовательности NM_008798.2 гена мышиноного PDCD1. SEQ ID NO: указаны в группах по 12, которые соответствуют «смысловым 19» SEQ ID NO: 216-227; «смысловым 21» SEQ ID NO: 228-239; «антисмысловым 21» SEQ ID NO: 240-251; «антисмысловым 19» SEQ ID NO: 252-263.

Таблица 10. Последовательности shPHK мышиноного PDCD1 (PD1)

Позиция на NM_008798.2	Участок-мишень	Смысловые 19	Смысловые 21	Антисмысловые 21	Антисмысловые 19
176	CDS	GGAGGTCCCTCAC CTTCTA (SEQ ID NO: 216)	CTGGAGGTCCC TCACCTCTA (SEQ ID NO: 228)	TAGAAGGTGAGG GACCTCCAG (SEQ ID NO: 240)	TAGAAGGTGAGG GACCTCC (SEQ ID NO: 252)
260	CDS	CGGAGGATCTTAT GCTGAA (SEQ ID NO: 217)	GTCGGAGGATCT TATGCTGAA (SEQ ID NO: 229)	TTCAGCATAAGA TCCTCCGAC (SEQ ID NO: 241)	TTCAGCATAAGA TCCTCCG (SEQ ID NO: 253)
359	CDS	CCCGCTTCCAGAT CATACA (SEQ ID NO: 218)	TGCCCGCTTCC AGATCATACA (SEQ ID NO: 230)	TGTATGATCTGG AAGCGGGCA (SEQ ID NO: 242)	TGTATGATCTGG AAGCGGG (SEQ ID NO: 254)
528	CDS	GGAGACCTCAACA AGATAT (SEQ ID NO: 219)	CTGGAGACCTC AACAAGATAT (SEQ ID NO: 231)	ATATCTTGTTGA GGTCTCCAG (SEQ ID NO: 243)	ATATCTTGTTGA GGTCTCC (SEQ ID NO: 255)
581	CDS	AAGGCATGGTCAT TGGTAT (SEQ ID NO: 220)	TCAAGGCATGG TCATTGGTAT (SEQ ID NO: 232)	ATACCAATGACC ATGCCTTGA (SEQ ID NO: 244)	ATACCAATGACC ATGCCTT (SEQ ID NO: 256)
584	CDS	GCATGGTCATTGG TATCAT (SEQ ID NO: 221)	AGGCATGGTCA TTGGTATCAT (SEQ ID NO: 233)	ATGATACCAATG ACCATGCCT (SEQ ID NO: 245)	ATGATACCAATG ACCATGC (SEQ ID NO: 257)

588	CDS	GGTCATTGGTATC ATGAGT (SEQ ID NO: 222)	ATGGTCATTGG TATCATGAGT (SEQ ID NO: 234)	ATGGTCATTGGT ATCATGAGT (SEQ ID NO: 246)	ATGGTCATTGGT ATCATGA (SEQ ID NO: 258)
609	CDS	CCTAGTGGGTATC CCTGTA (SEQ ID NO: 223)	GCCCTAGTGGG TATCCCTGTA (SEQ ID NO: 235)	GCCCTAGTGGGT ATCCCTGTA (SEQ ID NO: 247)	GCCCTAGTGGGT ATCCCTG (SEQ ID NO: 259)
919	CDS	GAGGATGGACATT GTTCTT (SEQ ID NO: 224)	ATGAGGATGGA CATGTGTTCTT (SEQ ID NO: 236)	ATGAGGATGGAC ATTGTTCTT (SEQ ID NO: 248)	ATGAGGATGGAC ATTGTTT (SEQ ID NO: 260)
1021	3'UTR	GCATGCAGGCTAC AGTTCA (SEQ ID NO: 225)	GAGCATGCAGG CTACAGTTCA (SEQ ID NO: 237)	GAGCATGCAGGC TACAGTTCA (SEQ ID NO: 249)	GAGCATGCAGGC TACAGTT (SEQ ID NO: 261)
1097	3'UTR	CCAGCACATGCAC TGTTGA (SEQ ID NO: 226)	TTCCAGCACAT GCACTGTTGA (SEQ ID NO: 238)	TTCCAGCACATG CACTGTTGA (SEQ ID NO: 250)	TTCCAGCACATG CACTGTT (SEQ ID NO: 262)
1101	3'UTR	CACATGCACTGTT GAGTGA (SEQ ID NO: 227)	AGCACATGCAC TGTTGAGTGA (SEQ ID NO: 239)	AGCACATGCACT GTTGAGTGA (SEQ ID NO: 251)	AGCACATGCACT GTTGAGT (SEQ ID NO: 263)

Ниже в таблице 11 приводятся названия агентов PDCD1 (PD1) RNAi (полученных из их позиции в последовательности гена PDCD1 человека) вместе с SEQ ID NO: 264-322, представляющими ДНК-последовательность. В таблице представлены как смысловые (S), так и антисмысловые (AS) последовательности, представленные как последовательности 19mer и 21mer. SEQ ID NO: указаны в группах по 12, которые соответствуют «смысловым 19» SEQ ID NO: 264-275; «смысловым 21» SEQ ID NO: 276-287; «антисмысловым 21» SEQ ID NO: 288-299; «антисмысловым 19» SEQ ID NO: 300-311.

Таблица 11. Последовательности shПНК мышиноного PDCD1 (PD1)

Позиция на NM_005018.2	Участок-мишень	Смысловые 19	Антисмысловые 19	Смысловые 21	Антисмысловые 21
145	CDS	GGCCAGGATGGT TCTTAGA (SEQ ID NO: 264)	TCTAAGAACCAT CCTGGCC (SEQ ID NO: 276)	GCGGCCAGGATG GTTCTTAGA (SEQ ID NO: 288)	TCTAAGAACCAT CCTGGCCGC (SEQ ID NO: 300)
271	CDS	GCTTCGTGCTAA ACTGGTA (SEQ ID NO: 265)	TACCAGTTTAGC ACGAAGC (SEQ ID NO: 277)	GAGCTTCGTGCT AAACTGGTA (SEQ ID NO: 289)	TACCAGTTTAGC ACGAAGCTC (SEQ ID NO: 301)
393	CDS	GGGCGTGACTTC CACATGA (SEQ ID NO: 266)	TCATGTGGAAGT CACGCC (SEQ ID NO: 278)	ACGGGCGTGACT TCCACATGA (SEQ ID NO: 290)	TCATGTGGAAGT CACGCCCGT (SEQ ID NO: 302)
1497	3'UTR	CAGGCCTAGAGA AGTTTCA (SEQ ID NO: 267)	TGAAACTTCTCT AGGCCTG (SEQ ID NO: 279)	TGCAGGCCTAGA GAAGTTTCA (SEQ ID NO: 291)	TGAAACTTCTCT AGGCCTGCA (SEQ ID NO: 303)
1863	3'UTR	CTTGGAACCCAT TCCTGAA (SEQ ID NO: 268)	TTCAGGAATGGG TTCCAAG (SEQ ID NO: 280)	TCCTTGGAACCC ATTCTGAA (SEQ ID NO: 292)	TTCAGGAATGGG TTCCAAGGA (SEQ ID NO: 304)
1866	3'UTR	GGAACCCATTCC TGAAATT (SEQ ID NO: 269)	AATTTAGGAAT GGGTTC (SEQ ID NO: 281)	TGGAACCCATT CCTGAAATT (SEQ ID NO: 293)	AATTTAGGAAT GGGTTC (SEQ ID NO: 305)
1867	3'UTR	GAACCCATTCTT GAAATTA (SEQ ID NO: 270)	TAATTTAGGAAT TGGGTTT (SEQ ID NO: 282)	TGGAACCCATT CTGAAATTA (SEQ ID NO: 294)	TAATTTAGGAAT TGGGTTTCA (SEQ ID NO: 306)
1868	3'UTR	AACCCATTCTTG AAATTAT (SEQ ID NO: 271)	ATAATTTAGGA ATGGGTT (SEQ ID NO: 283)	GGAACCCATTCC TGAAATTAT (SEQ ID NO: 295)	ATAATTTAGGA ATGGGTTCC (SEQ ID NO: 307)
1869	3'UTR	ACCCATTCTTGA AATTATT (SEQ ID NO: 272)	AATAATTTAGG AATGGGT (SEQ ID NO: 284)	GAACCCATTCTT GAAATTATT (SEQ ID NO: 296)	AATAATTTAGG AATGGGTTT (SEQ ID NO: 308)
1870	3'UTR	CCCATTCTTGAA ATTATTT (SEQ ID NO: 273)	AAATAATTTAG GAATGGG (SEQ ID NO: 285)	AACCCATTCTTG AAATTATTT (SEQ ID NO: 297)	AAATAATTTAG GAATGGGTT (SEQ ID NO: 309)
2079	3'UTR	CTGTGGTTCTAT TATATTA (SEQ ID NO: 274)	TAATATAATAGA ACCACAG (SEQ ID NO: 286)	CCCTGTGGTTCT ATTATATTA (SEQ ID NO: 298)	TAATATAATAGA ACCACAGGG (SEQ ID NO: 310)
2109	3'UTR	AAATATGAGAGC ATGCTAA (SEQ ID NO: 275)	TTAGCATGCTCT CATATTT (SEQ ID NO: 287)	TTAAATATGAGA GCATGCTAA (SEQ ID NO: 299)	TTAGCATGCTCT CATATTTAA (SEQ ID NO: 311)

В одном воплощении ингибитор ингибирующего сигнала может представлять собой, например, антитело или фрагмент антитела, который связывается с ингибирующей молекулой. Например, средство может представлять собой антитело или фрагмент антитела, который связывается с PD1, PD-L1, PD-L2 или CTLA4 (например, ипилимумаб (также называемый MDX-010 и MDX-101, и продаваемый как Yervoy®; Bristol-Myers Squibb; тремилумаб (моноклональное антитело IgG2, доступное от Pfizer, официально известное как тиклумаб CP-675206)). В одном воплощении средство представляет собой антитело или фрагмент антитела, который связывается с LAG3. В воплощениях средство, которое усиливает активность CAR-экспрессирующей молекулы, вводят в комбинации с аллогенным CAR, например, аллогенным CAR, описанным в настоящем описании (например, описанным в настоящем описании в разделе «Аллогенный CAR»).

PD-1 является ингибирующим членом семейства CD28 рецепторов, которое также включает CD28, CTLA-4, ICOS и BTLA. PD-1 экспрессируется на активированных В-клетках, Т-клетках и миелоидных клетках (Agata et al., 1996, *Int. Immunol.*, 8: 765-75). Показано, что два лиганда для PD-1 PD-L1 и PD-L2 отрицательно регулируют активацию Т-клеток после связывания с PD-1 (Freeman et al., 2000, *J. Exp. Med.*, 192: 1027-34; Latchman et al., 2001, *Nat. Immunol.*, 2: 261-8; Carter et al., 2002, *Eur. J. Immunol.*, 32: 634-43). PD-1 распространен при раковых заболеваниях человека (Dong et al., 2003, *J. Mol. Med.*, 81: 281-7; Blank et al., 2005, *Cancer Immunol. Immunother.*, 54: 307-314; Konishi et al., 2004, *Clin. Cancer Res.*, 10: 5094). Иммунную супрессию можно реверсировать путем ингибирования локального взаимодействия PD-1 и PD-L1. Антитела, фрагменты антител и другие ингибиторы PD-1, PD-L1 и PD-L2 доступны в технике и могут использоваться в комбинации с CAR по настоящему изобретению, описанными в настоящем описании. Например, ниволумаб (также называемый BMS-936558 или MDX1106; Bristol-Myers Squibb) представляет собой полное человеческое моноклональное антитело IgG4, которое специфически блокирует PD-1. Ниволумаб (клон 5C4) и другие человеческие моноклональные антитела, которые специфически связываются с PD-1, описаны в US 8008449 и WO2006/121168. Пидилизумаб (CT-011; Cure Tech) представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG1k, которое связывается с PD-1. Пидилизумаб и другие гуманизированные моноклональные антитела раскрыты в WO2009/101611. Пембролизумаб (официально известный как ламбролизумаб, и также называемый MK03475; Merck) представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG4, которое связывается с PD-1. Пембролизумаб и другие гуманизированные анти-PD-1 антитела раскрыты в US 8354509 and WO2009/114335. MEDI4736 (медиммун) представляет собой человеческое моноклональное антитело, которое связывается с PDL1 и ингибирует взаимодействие лиганда с PD1. MDPL3280A (Genentech/Roche) представляет собой человеческое моноклональное антитело IgG1, оптимизированное Fc, которое связывается с PD-L1. MDPL3280A и другие человеческие моноклональные антитела к PD-L1 раскрыты в патенте США № 7943743 и публикации U.S № 20120039906. Другие анти-PD-L1 связывающие агенты включают YW243.55.S70 (вариабельные участки тяжелой и легкой цепи показаны в SEQ ID NO: 20 и 21 в WO2010/077634) и MDX-1105 (также называемый BMS-936559, и, например, анти-PD-L1 связывающие агенты, раскрытые в WO2007/005874). AMP-224 (B7-DCIg; амплимун; например, раскрытый в WO2010/027827 и WO2011/066342) представляет собой PD-L2-Fc слитый растворимый рецептор, который блокирует взаимодействие между PD-1 и B7-H1. Другие анти-PD-1 антитела включают AMP 514 (амплимун), и среди других, например, анти-PD-1 антитела, раскрытые в US 8609089, US 2010028330 и/или US 20120114649.

TIM3 (Т-клеточный иммуноглобулин 3) также отрицательно регулирует Т-клеточную

функцию, в частности, в IFN- γ секретирующих CD4⁺ хелперных Т- и цитотоксических 1 CD8⁺ Т-клетках, и играет критичную роль в истощении Т-клеток. Ингибирование взаимодействия между TIM3 и его лигандами, например, галектином-9 (Gal9), фосфотидилсерином (PS) и HMGB1 может усилить иммунную реакцию. Антитела, фрагменты антител и другие ингибиторы TIM3 и его лигандов доступны в технике и могут использоваться в комбинации с CD19-CAR, описанным в настоящем описании. Например, антитела, фрагменты антител, малые молекулы или ингибиторы пептидов, которые таргетируют TIM3, связываются с доменом IgV TIM3 и ингибируют взаимодействие с его лигандами. Антитела и пептиды, которые ингибируют TIM3, раскрыты в WO2013/006490 и US20100247521. Другие анти-TIM3 антитела включают гуманизированные варианты RMT3-23 (раскрыты в Ngiew et al., 2011, *Cancer Res.*, 71: 3540-3551) и клон 8B.2C12 (раскрыт в Monney et al., 2002, *Nature*, 415: 536-541). Биспецифические антитела, которые ингибируют TIM3 и PD-1, раскрыты в US20130156774.

В других воплощениях средство, которое усиливает антивность CAR-экспрессирующей клетки, представляет собой ингибитор CEACAM (например, ингибитор CEACAM-1, CEACAM-3, и/или CEACAM-5). В одном воплощении ингибитор CEACAM представляет собой молекулу анти-CEACAM антитела. Примеры анти-CEACAM-1 антител описаны в WO 2010/125571, WO 2013/082366, WO 2014/059251 и WO 2014/022332, например, моноклональные антитела 34B1, 26H7 и 5F4; или их рекомбинантные формы, описанные, например, в US 2004/0047858, US 7132255 и WO 99/052552. В других воплощениях анти-CEACAM антитело связывается с CEACAM-5, как описано в, например, Zheng et al., *PLoS One.*, 2010, Sep. 2; 5(9), pii: e12529 (DOI:10.1371/journal.pone.0021146), или вступает в перекрестную реакцию с CEACAM-1 и CEACAM-5, как описано, например, в WO 2013/054331 и US 2014/0271618.

Без желания привязываться к теории, полагают, что факторы адгезии клеток с карциноэмбриональным антигеном (CEACAM), такие как CEACAM-1 и CEACAM-5, опосредуют по меньшей мере ингибирование противоопухолевой иммунной реакции (см., например, Markel et al., *J. Immunol.*, 2002, Mar, 15; 168(6): 2803-10; Markel et al., *J. Immunol.*, 2006, Nov, 1; 177(9): 6062-71; Markel et al., *Immunology*, 2009, Feb; 126(2): 186-200; Markel et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 2010, Feb; 59(2): 215-30; Ortenberg et al., *Mol. Cancer Ther.*, 2012, Jun; 11(6): 1300-10; Stern et al., *J. Immunol.*, 2005, Jun 1; 174(11): 6692-701; Zheng et al., *PLoS One*, 2010, Sep. 2; 5(9). pii: e12529). Например, CEACAM-1 описан как гетерофильный лиганд для TIM-3 и как играющий роль в TIM-3-

опосредованной переносимости и истощения Т-клеток (см., например, WO 2014/022332; Huang et al. (2014), *Nature*, doi:10.1038/nature13848). В воплощениях показано, что совместная блокада CEACAM-1 и TIM-3 усиливает противоопухолевую иммунную реакцию на моделях с ксенотрансплантатом колоректального рака (см., например, WO 2014/022332; Huang et al., (2014), цит. выше). В других воплощениях совместная блокада CEACAM-1 и PD-1 снижает Т-клеточную переносимость, как описано, например, в WO 2014/059251. Таким образом, ингибиторы CEACAM можно использовать с другими иммуномодуляторами, описанными в настоящем описании (например, анти-PD-1 и/или анти-TIM-3 ингибиторами), для усиления иммунной реакции против рака, например, меланомы, рака легких (например, NSCLC), рака мочевого пузыря, рака толстой кишки, рака яичников и других раковых заболеваний, как описано в настоящем описании.

LAG3 (ген активации лимфоцитов 3 или CD223) представляет собой молекулу клеточной поверхности, экспрессированную на активированных Т-клетках и В-клетках, которые, как показано, играют роль в истощении CD8⁺ Т-клеток. Антитела, фрагменты

антител и другие ингибиторы LAG3 и его лиганды доступны в технике и могут использоваться в комбинации с CD19-CAR, описанным в настоящем описании. Например, BMS-986016 (Bristol-Myers Squibb) представляет собой моноклональное антитело, которое таргетирует LAG3. IMP701 (иммутеп) является антителом антагонистом LAG3, и IMP731 (иммутеп и глукосамиткляйн) является антителом, истощающим LAG3. Другие ингибиторы LAG3 включают IMP321 (иммутеп), который представляет собой рекомбинантный слитый белок растворимой части LAG3 и Ig, который связывается с молекулами ГКГС класса II и активирует антигенпрезентирующие клетки (APC). Другие антитела раскрыты, например, в WO2010/019570.

В некоторых воплощениях средство, которое усиливает активность CAR-экспрессирующей клетки, может представлять собой, например, слитый белок, включающий первый домен и второй домен, причем первый домен представляет собой ингибирующую молекулу или ее фрагмент, и второй домен представляет собой полипептид, который ассоциирован с положительным сигналом, например, полипептид, включающий внутриклеточный сигнальный домен, описанный в настоящем описании.

В некоторых воплощениях полипептид, который ассоциирован с положительным сигналом, может включать костимулирующий домен из CD28, CD27, ICOS, например, внутриклеточный сигнальный домен CD28, CD27 и/или ICOS, и/или первичный сигнальный домен, например, CD3-дзета, например, описанный в настоящем описании.

В одном воплощении слитый белок экспрессируется клеткой, например, Т-клеткой, которая не экспрессирует анти-CLL-1-CAR.

В одном воплощении средство, которое усиливает активность CAR-экспрессирующей клетки, описанной в настоящем описании, представляет собой miR-17-92.

В одном воплощении средство, которое усиливает активность CAR-экспрессирующей клетки, описанной в настоящем описании, представляет собой цитокин. Цитокины имеют важные функции, связанные с экспансией, дифференцировкой, выживанием и гомеостазом Т-клеток. Цитокины, которые можно вводить субъекту, получающему CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, включают IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-18 и IL-21 или их комбинацию. В предпочтительных воплощениях вводимый цитокин представляет собой IL-7, IL-15 или IL-21 или их комбинацию. Цитокин можно вводить один раз в день или чаще, чем один раз в день, например, дважды в день, три раза в день или четыре раза в день. Цитокин можно вводить более, чем один день, например, цитокин вводят 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели или 4 недели. Например, цитокин вводят один раз в день в течение 7 дней.

В воплощениях цитокин вводят в комбинации с CAR-экспрессирующими Т-клетками. Цитокин можно вводить совместно или одновременно с CAR-экспрессирующими Т-клетками, например, вводить в один и тот же день. Цитокин можно получить в тех же фармацевтических композициях, что и CAR-экспрессирующие Т-клетки, или можно получить в отдельной фармацевтической композиции. С другой стороны, цитокин можно вводить вскоре после введения CAR-экспрессирующих Т-клеток, например, через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней или 7 дней после введения CAR-экспрессирующих Т-клеток. В воплощениях, в которых цитокин вводят по схеме, когда введение происходит дольше, чем один день, первый день схемы введения цитокина может быть тем же днем, когда вводят CAR-экспрессирующие Т-клетки, или первый день схемы введения цитокина может иметь место через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней или 7 дней после введения CAR-экспрессирующих Т-клеток. В одном воплощении в первый день субъекту вводят CAR-экспрессирующие Т-клетки, и на второй день вводят цитокин один раз в день в течение следующих 7 дней. В

предпочтительном воплощении цитокин для введения в комбинации с CAR-экспрессирующими Т-клетками представляет собой IL-7, IL-15 или IL-21.

В других воплощениях цитокин вводят через некоторое время после введения CAR-экспрессирующих Т-клеток, например, по меньшей мере через 2 недели, 3 недели, 4 недели, 6 недель, 8 недель, 10 недель, 12 недель, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев или 1 год после введения CAR-экспрессирующих Т-клеток. В одном воплощении цитокин вводят после оценки реакции субъекта на CAR-экспрессирующие клетки. Например, субъекту вводят CAR-экспрессирующие клетки согласно дозировкам и схемам, описанным в настоящем описании. Реакцию субъекта на терапию CAR-экспрессирующими клетками оценивают через 2 недели, 3 недели, 4 недели, 6 недель, 8 недель, 10 недель, 12 недель, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев или 1 год или более после введения CAR-экспрессирующих Т-клеток с использованием любого из способов, описанных в настоящем описании, включая рост опухоли, снижение числа опухолевых клеток в кровотоке или регрессию опухоли. Субъектам, которые не показывают достаточную реакцию на терапию CAR-экспрессирующими клетками, можно ввести цитокин. Введение цитокина субъекту с субоптимальной реакцией на терапию CAR-экспрессирующими клетками улучшает эффективность CAR-экспрессирующих клеток или противораковую активность. В предпочтительном воплощении цитокин, вводимый после введения CAR-экспрессирующих клеток, представляет собой IL-7.

Комбинация с малой иммуностимулирующей дозой ингибитора mTOR

В способах, описанных в настоящем описании, используются малые иммуностимулирующие дозы ингибиторов mTOR, например, аллостерических ингибиторов mTOR, включая рапалоги, такие как RAD001. Введение малой иммуностимулирующей дозы ингибитора mTOR (например, дозы, которая недостаточна для полной супрессии иммунной системы, но достаточна для улучшения иммунной функции) может оптимизировать производительность иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток или CAR-экспрессирующих клеток, у субъекта. Способы измерения ингибирования mTOR, дозировки, схемы лечения и подходящие фармацевтические композиции описаны в заявке на патент США № 2015/01240036, включенной в настоящее описание в качестве ссылки.

В одном воплощении введение малой иммуностимулирующей дозы ингибитора mTOR может привести к одному или более из следующих явлений:

- i) уменьшение числа PD-1 положительных иммунных эффекторных клеток;
- ii) повышение числа PD-1 отрицательных иммунных эффекторных клеток;
- iii) повышение отношения PD-1 отрицательные иммунные эффекторные клетки/PD-1 положительные иммунные эффекторные клетки;
- iv) повышение числа наивных Т-клеток;
- v) усиление экспрессии одного или нескольких из следующих маркеров: CD62L^{high}, CD127^{high}, CD27⁺ и BCL2, например, в Т-клетках памяти, например, предшественниках Т-клеток памяти;
- vi) уменьшение экспрессии KLRG1, например, в Т-клетках памяти, например, предшественниках Т-клеток памяти; или
- vii) повышение числа предшественников Т-клеток памяти, например, клеток с одной из комбинаций следующих характеристик: повышенный CD62L^{high}, повышенный CD127^{high}, повышенный CD27⁺, сниженный KLRG1 и повышенный BCL2;

причем любое из явлений, описанных выше, например, i), ii), iii), iv), v), vi) или vii), происходит, например, по меньшей мере временно, например, по сравнению с субъектом, не получавшим лечение.

В другом воплощении введение малой иммуностимулирующей дозы ингибитора mTOR приводит к усиленной или продленной пролиферации или персистенции CAR-экспрессирующих клеток, например, в культуре или у субъекта, например, по сравнению с необработанными CAR-экспрессирующими клетками или субъектом, не получавшим лечение. В воплощении усиленная пролиферация ассоциируется с повышением числа CAR-экспрессирующих клеток. Способы измерения усиленной или продленной пролиферации описаны в примерах 8 и 9. В другом воплощении введение малой иммуностимулирующей дозы ингибитора mTOR приводит к усиленному киллингу раковых клеток CAR-экспрессирующими клетками, например, в культуре или у субъекта, например, по сравнению с необработанными CAR-экспрессирующими клетками или субъектом, не получавшим лечение. В воплощении усиленный киллинг раковых клеток ассоциируется с уменьшением объема опухоли. Способы измерения усиленного киллинга раковых клеток описаны в примере 2.

В одном воплощении клетки, экспрессирующие молекулу CAR, например, молекулу CAR, описанную в настоящем описании, вводят в комбинации с малой иммуностимулирующей дозой ингибитора mTOR, например, аллостерического ингибитора mTOR, например, RAD001, или каталитического ингибитора mTOR. Например, введение малой иммуностимулирующей дозы ингибитора mTOR может быть инициировано до введения CAR-экспрессирующей клетки, описанной в настоящем описании; завершено до введения CAR-экспрессирующей клетки, описанной в настоящем описании; начато в то же время, что и введение CAR-экспрессирующей клетки, описанной в настоящем описании; может перекрывать введение CAR-экспрессирующей клетки, описанной в настоящем описании; или продолжаться после введения CAR-экспрессирующей клетки, описанной в настоящем описании.

С другой стороны или кроме того, введение малой иммуностимулирующей дозы ингибитора mTOR может оптимизировать инженеринг иммунных эффекторных клеток для экспрессии молекулы CAR, описанной в настоящем описании. В таких воплощениях введение малой иммуностимулирующей дозы ингибитора mTOR, например, аллостерического ингибитора mTOR, например, RAD001, или каталитического ингибитора mTOR, начинают или завершают до сбора у субъекта иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток или NK-клеток, для конструирования для экспрессии молекулы CAR, описанной в настоящем описании.

В другом воплощении иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки или NK-клетки, которые конструируют для экспрессии молекулы CAR, описанной в настоящем описании, например, после сбора у субъекта, или CAR-экспрессирующие эффекторные клетки, например, Т-клетки или NK-клетки, например, до введения субъекту, можно культивировать в присутствии малой иммуностимулирующей дозы ингибитора mTOR.

В одном воплощении введение субъекту малой иммуностимулирующей дозы ингибитора mTOR включает введение, например, один раз в неделю, например, в лекарственной форме с немедленным высвобождением 0,1-20, 0,5-10, 2,5-7,5, 3-6 или примерно 5 мг RAD001 или его биоэквивалентной дозы. В одном воплощении введение субъекту малой иммуностимулирующей дозы ингибитора mTOR включает введение, например, один раз в неделю, например, в лекарственной форме с пролонгированным высвобождением 0,3-60, 1,5-30, 7,5-22,5, 9-18 или примерно 15 мг RAD001 или его биоэквивалентной дозы.

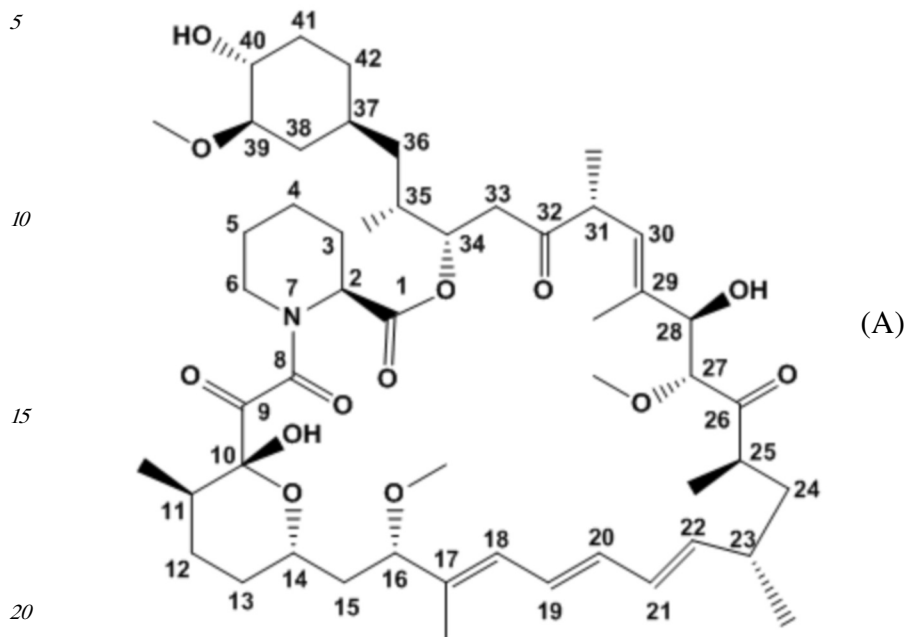
В одном воплощении доза ингибитора mTOR связана с или обеспечивает ингибирование mTOR по меньшей мере на 5, но не более, чем на 90%, по меньшей мере на 10, но не более, чем на 90%, по меньшей мере на 15, но не более, чем на 90%, по меньшей мере на 20, но не более, чем на 90%, по меньшей мере на 30, но не более, чем на 90%, по меньшей мере на 40, но не более, чем на 90%, по меньшей мере на 50, но не более, чем на 90%, по меньшей мере на 60, но не более, чем на 90%, по меньшей мере на 70, но не более, чем на 90%, по меньшей мере на 5, но не более, чем на 80%, по меньшей мере на 10, но не более, чем на 80%, по меньшей мере на 15, но не более, чем на 80%, по меньшей мере на 20, но не более, чем на 80%, по меньшей мере на 30, но не более, чем на 80%, по меньшей мере на 40, но не более, чем на 80%, по меньшей мере на 50, но не более, чем на 80%, по меньшей мере на 60, но не более, чем на 80%, по меньшей мере на 5, но не более, чем на 70%, по меньшей мере на 10, но не более, чем на 70%, по меньшей мере на 15, но не более, чем на 70%, по меньшей мере на 20, но не более, чем на 70%, по меньшей мере на 30, но не более, чем на 70%, по меньшей мере на 40, но не более, чем на 70%, по меньшей мере на 50, но не более, чем на 70%, по меньшей мере на 5, но не более, чем на 60%, по меньшей мере на 10, но не более, чем на 60%, по меньшей мере на 15, но не более, чем на 60%, по меньшей мере на 20, но не более, чем на 60%, по меньшей мере на 30, но не более, чем на 60%, по меньшей мере на 40, но не более, чем на 60%, по меньшей мере на 5, но не более, чем на 50%, по меньшей мере на 10, но не более, чем на 50%, по меньшей мере на 15, но не более, чем на 50%, по меньшей мере на 20, но не более, чем на 50%, по меньшей мере на 30, но не более, чем на 50%, по меньшей мере на 40, но не более, чем на 50%, по меньшей мере на 5, но не более, чем на 40%, по меньшей мере на 10, но не более, чем на 40%, по меньшей мере на 15, но не более, чем на 40%, по меньшей мере на 20, но не более, чем на 40%, по меньшей мере на 30, но не более, чем на 40%, по меньшей мере на 35, но не более, чем на 40%, по меньшей мере на 5, но не более, чем на 30%, по меньшей мере на 10, но не более, чем на 30%, по меньшей мере на 15, но не более, чем на 30%, по меньшей мере на 20, но не более, чем на 30%, или по меньшей мере на 25, но не более, чем на 30%.

Степень ингибирования mTOR может быть передана как или соответствует степени ингибирования киназы S6, например, степень ингибирования mTOR можно определить по уровню снижения активности киназы S6, например, по уменьшению фосфорилирования субстрата киназы S6. Уровень ингибирования mTOR можно оценить различными способами, такими как измерение активности киназы P70 S6 анализом Boulay, как описано в заявке на патент США № 2015/01240036, включенной в настоящее описание в качестве ссылки, или как описано в патенте США № 7727950, включенном в настоящее описание в качестве ссылки; измерение уровня фосфорилированной S6 вестерн-блоттингом или оценка изменения в отношении PD1 отрицательные иммунные эффекторные клетки/PD1 положительные иммунные эффекторные клетки.

Используемый в настоящем описании термин «ингибитор mTOR» относится к соединению или лиганду или его фармацевтически приемлемой соли, которые ингибируют киназу mTOR в клетке. В одном воплощении ингибитор mTOR представляет собой аллостерический ингибитор. Аллостерические ингибиторы mTOR включают нейтральное трициклическое соединение рапамицин (сиролимус), родственные рапамицину соединения, т.е., соединения, имеющие структурное и функциональное подобие рапамицину, включая, например, производные рапамицина, аналоги рапамицина (также называемые рапалогами) и другие макролидные соединения, которые ингибируют активность mTOR. В одном воплощении ингибитор mTOR представляет собой

каталитический ингибитор.

Рапамицин является известным макролидным антибиотиком, продуцируемым *Streptomyces hygroscopicus*, имеющим структуру, показанную формулой А.



См., например, McAlpine J.B. et al., J. Antibiotics (1991), 44: 688; Schreiber S.L. et al., J. Am. Chem. Soc. (1991), 113: 7433; патент США № 3929992. Существуют различные схемы, предложенные для рапамицина. Для того, чтобы избежать путаницы, когда в настоящем описании называются конкретные аналоги рапамицина, названия даны со ссылкой на рапамицин с использованием схемы нумерации формулы А.

Аналоги рапамицина, применимые в изобретении, представляют собой, например, О-замещенные аналоги, в которых гидроксильная группа на циклогексильном цикле рапамицина замещена OR_1 , в которой R_1 представляет собой гидроксипалкил, гидроксипалкоксиалкил, ациламиноалкил или аминалкил; например, RAD001, также известный как эверолимус, как описано в US 5665772 и WO94/09010, включенных в настоящее описание в качестве ссылок. Другие подходящие аналоги рапамицина включают аналоги, замещенные в положении 26 или 28. Аналог рапамицина может представлять собой эпимер аналога, указанного выше, в частности, эпимер аналога, замещенного в положении 40, 28 или 26, и необязательно может быть дополнительно гидрирован, например, как описано в US 7091213, WO98/02441 и WO01/14387, включенных в настоящее описание в качестве ссылок, например, AP23573, также известный как рифафоролимус.

Примеры аналогов рапамицина из US 5665772, подходящих для применения в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются перечисленным, 40-О-бензил-рапамицин, 40-О-(4'-гидроксиметил)бензилрапамицин, 40-О-[4'-(1,2-дигидроксиэтил)] бензилрапамицин, 40-О-аллилрапамицин, 40-О-[3'-(2,2-диметил-1,3-диоксолан-4(S)-ил)-проп-2'-ен-1'-ил]рапамицин, (2'E,4'S)-40-О-(4',5'-дигидроксипент-2'-ен-1'-ил)рапамицин, 40-О-(2-гидрокси)этоксикарбонилметилрапамицин, 40-О-(2-гидрокси)этилрапамицин, 40-О-(3-гидрокси)пропилрапамицин, 40-О-(6-гидрокси)гексилрапамицин, 40-О-[2-(2-гидрокси)этоксипропил]этилрапамицин, 40-О-[(3S)-2,2-диметилдиоксолан-3-ил]метилрапамицин, 40-О-[(2S)-2,3-дигидроксипроп-1-ил]-рапамицин, 40-О-(2-ацетокси)этилрапамицин, 40-О-(2-никотиноилокси)этилрапамицин, 40-О-[2-(N-морфолино)ацетокси]этилрапамицин,

40-О-(2-N-имидазолилацетокси)этилрапамицин, 40-О-[2-(N-метил-N'-пиперазинил)ацетокси]этилрапамицин, 39-О-десметил-39,40-О,О-этиленрапамицин, (26R)-26-дигиро-40-О-(2-гидроксид)этилрапамицин, 40-О-(2-аминоэтил)рапамицин, 40-О-(2-ацетамидоэтил)рапамицин, 40-О-(2-никотинамидоэтил)рапамицин, 40-О-(2-(N-метилимидазо-2'-илкарбэтоксамидо)этил)рапамицин, 40-О-(2-этоксикарбониламиноэтил)рапамицин, 40-О-(2-толилсульфонамидоэтил)рапамицин и 40-О-[2-(4',5'-дикарбэтоксид-1',2',3'-триазол-1'-ил)этил]рапамицин.

Другие аналоги рапамицина, применимые в настоящем изобретении, представляют собой аналоги, в которых гидроксильная группа на циклогексильном цикле рапамицина и/или гидроксигруппа в положении 28 заменена сложной гидроксифирной группой, например, аналоги рапамицина, найденные в US RE44768, например, темсиролимус.

Другие аналоги рапамицина, применимые в настоящем изобретении, включают аналоги, в которых метоксигруппа в положении 16 заменена другим заместителем, предпочтительно (необязательно гидроксизамещенным) алкинилокси, бензилом, ортометоксибензилом или хлоробензилом, и/или где метоксигруппа в положении 39 удалена вместе с углеродом 39, так что циклогексильный цикл рапамицина становится циклопентильным циклом, утрачивая метоксигруппу в положении 39; например, как описано в WO95/16691 и WO96/41807, включенных в настоящее описание в качестве ссылок. Аналоги также могут быть модифицированы так, что гидроксид в положении 40 рапамицина алкилируется и/или восстанавливается карбонил 32.

Аналоги рапамицина из WO95/16691 включают, но не ограничиваются перечисленным, 16-деметокси-16-(пент-2-инил)оксирапамицин, 16-деметокси-16-(бут-2-инил)оксирапамицин, 16-деметокси-16-(пропаргил)оксирапамицин, 16-деметокси-16-(4-гидроксидбут-2-инил)оксирапамицин, 16-деметокси-16-бензилокси-40-О-(2-гидроксиэтил)рапамицин, 16-деметокси-16-бензилоксирапамицин, 16-деметокси-16-ортометоксибензилрапамицин, 16-деметокси-40-О-(2-метоксиэтил)-16-пент-2-инил)оксирапамицин, 39-деметокси-40-дезоксид-39-формил-42-норрапамицин, 39-деметокси-40-дезоксид-39-гидроксиметил-42-норрапамицин, 39-деметокси-40-дезоксид-39-карбокси-42-норрапамицин, 39-деметокси-40-дезоксид-39-(4-метилпиперазин-1-ил)карбонил-42-норрапамицин, 39-деметокси-40-дезоксид-39-(морофлин-4-ил)карбонил-42-норрапамицин, 39-деметокси-40-дезоксид-39-[N-метил,N-(2-пиридин-2-илэтил)]карбамоил-42-норрапамицин и 39-деметокси-40-дезоксид-39-(п-толуолсульфонилгидразонометил)-42-норрапамицин.

Аналоги рапамицина из WO96/41807 включают, но не ограничиваются перечисленным, 32-дезоксоррапамицин, 16-О-пент-2-инил-32-дезоксоррапамицин, 16-О-пент-2-инил-32-дезоксид-40-О-(2-гидроксиэтил)рапамицин, 16-О-пент-2-инил-32-(S)-дигидро-40-О-(2-гидроксиэтил)рапамицин, 32(S)-дигидро-40-О-(2-метокси)этилрапамицин и 32(S)-дигидро-40-О-(2-гидроксиэтил)рапамицин.

Другим подходящим аналогом рапамицина является умиролимус, описанный в US2005/0101624, включенной в настоящее описание в качестве ссылки.

RAD001, иначе известный как эверолимус (афинитор®), имеет химическое название (1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28E,30S,32S,35R)-1,18-дигидрокси-12-{(1R)-2-[(1S,3R,4R)-4-(2-гидроксиэтоксид)-3-метоксициклогексил]-1-метилэтил}-19,30-диметокси-15,17,21,23,29,35-гексаметил-11,36-диоксид-4-азатрицикло[30.3.1.0^{4,9}]гексатриаконта-16,24,26,28-тетраен-2,3,10,14,20-пентаон, как описано в US 5665772 и WO94/09010, включенных в настоящее описание в качестве ссылок.

Другие примеры аллостерических ингибиторов mTOR включают сиролимус (рапамицин, AY-22989), 40-[3-гидрокси-2-(гидроксиметил)-2-метил пропаноат]рапамицин

(также называемый темсиролимусом или CCI-779) и ридафоролимус (AP-23573/-8669). Другие примеры аллостерических ингибиторов mTOR включают зотаролимус (ABT578) и умиролимус.

С другой стороны или дополнительно обнаружено, что АТФ-конкурентные ингибиторы mTOR таргетируют непосредственно домен киназы mTOR, и таргетируют как mTORC1, так и mTORC2. Они также являются более эффективными ингибиторами mTORC1, чем такие аллостерические ингибиторы mTOR, как рапамицин, поскольку они модулируют устойчивые к рапамицину действия mTORC1, такие как фосфорилирование 4EBP1-T37/46 и кэпзависимая трансляция.

Каталитические ингибиторы включают BEZ235 или 2-метил-2-[4-(3-метил-2-оксо-8-хинолин-3-ил-2,3-дигидроимидазо[4,5-с]хинолин-1-ил)фенил]пропионитрил или форму соли монотозилата. Синтез BEZ235 описан в WO2006/122806; CCG168 (иначе известный как AZD-8055, Chresta C.M., et al., Cancer Res., 2010, 70(1), 288-298), который имеет химическое название {5-[2,4-бис-((S)-3-метилморфолин-4-ил)пиридо[2,3-d]пиримидин-7-ил]-2-метокси-фенил}метанол; 3-[2,4-бис[(3S)-3-метилморфолин-4-ил]пиридо[2,3-d]пиримидин-7-ил]-N-метилбензамид (WO09104019); 3-(2-аминобензо[d]оксазол-5-ил)-1-изопропил-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-4-амин (WO10051043 и WO2013023184); A N-(3-(N-(3-((3,5-диметоксифенил)амино)хиноксалин-2-ил)сульфамоил)фенил)-3-метокси-4-метилбензамид (WO07044729 и WO12006552); PKI-587 (Venkatesan A.M., J. Med.Chem., 2010, 53, 2636-2645), который имеет химическое название 1-[4-[4-(диметиламино)пипридин-1-карбонил]фенил]-3-[4-(4,6-диморфолино-1,3,5-триазин-2-ил)фенил]мочевина; GSK-2126458 (ACS Med. Chem. Lett., 2010, 1, 39-43), который имеет химическое название 2,4-дифтор-N-{2-метокси-5-[4-(4-пиридазинил)-6-хинолинил]-3-пиридирил}бензолсульфонамид; 5-(9-изопропил-8-метил-2-морфолино-9H-пурин-6-ил)пиримидин-2-амин (WO10114484); (E)-N-(8-(6-амино-5-(трифторметил)пиридин-3-ил)-1-(6-(2-цианопропан-2-ил)пиридин-3-ил)-3-метил-1H-имидазо[4,5-с]хинолин-2(3H)-илиден)цианамид (WO12007926).

Другие примеры каталитических ингибиторов mTOR включают 8-(6-метоксипиридин-3-ил)-3-метил-1-(4-пиперазин-1-ил-3-трифторметил-фенил)-1,3-дигидроимидазо[4,5-с]хинолин-2-он (WO2006/122806) и Ku-0063794 (Garcia-Martinez JM et al., Biochem. J., 2009, 421(1), 29-42. Ku-0063794 является специфическим ингибитором мишени рапамицина у млекопитающего (mTOR). WYE-354 представляет собой другой пример каталитического ингибитора mTor (Yu K. et al. (2009), Biochemical, Cellular, and In vivo Activity of Novel ATP-Competitive and Selective Inhibitors of the Mammalian Target of Rapamycin. Cancer Res. 69(15): 6232-6240).

Ингибиторы mTOR, применимые согласно настоящему изобретению, также включают их пролекарства, производные, фармацевтически приемлемые соли или аналоги любого из указанных выше.

Ингибиторы mTOR, такие как RAD001, можно ввести в композиции для доставки на основе хорошо известных способов в технике, основанных на определенных дозировках, описанных в настоящем описании. В частности, в патенте США 6004973 (включенном в настоящее описание в качестве ссылки) приводятся примеры композиций, которые можно применять с ингибиторами mTOR, описанными в настоящем описании.

Способы и биомаркеры для оценки эффективности CAR или пригодности образцов

В другом аспекте изобретение относится к способу оценки или контроля эффективности терапии CAR-экспрессирующими клетками (например, терапии CLL-1-CAR) для пациента (например, пациента, имеющего рак, например, гематологический рак) или пригодности образца (например, образца афереза) для CAR-терапии (например,

терапии CLL-1-CAR). Способ включает получение величины эффективности терапии CAR или пригодности образца, в котором указанная величина является показателем эффективности или пригодности терапии CAR-экспрессирующими клетками.

В воплощениях величина эффективности терапии с CAR или пригодности образца включает измерение одного, двух, трех, четырех, пяти, шести или более (всех) параметров из следующих:

(i) уровень активности одной, двух, трех или больше (например, всех) покоящихся клеток T_{EFF}, покоящихся клеток T_{REG}, молодых Т-клеток (например, молодых CD4 или CD8 клеток или гамма/дельта Т-клеток), или ранних Т-клеток памяти или их комбинации в образце (например, аферезном образце или образце продукта, произведенного CAR-экспрессирующей клеткой);

(ii) уровень активности одной, двух, трех или больше (например, всех) активированных T_{EFF}-клеток, активированных T_{REG}-клеток, старых Т-клеток (например, старых CD4 или CD8 клеток или гамма/дельта Т-клеток), или поздних Т-клеток памяти или их комбинации в образце (например, аферезном образце или образце продукта, произведенного CAR-экспрессирующей клеткой);

(iii) уровень активности маркера истощения иммунных клеток, например, одного, двух или больше иммунных реперных ингибиторов (например, PD-1, PD-L1, TIM-3 и/или LAG-3) в образце (например, аферезном образце или образце продукта, произведенного CAR-экспрессирующей клеткой) (В одном воплощении иммунная клетка имеет истощенный фенотип, например, коэкспрессирует по меньшей мере два маркера истощения, например, коэкспрессирует PD-1 и TIM-3. В других воплощениях иммунная клетка имеет истощенный фенотип, например, коэкспрессирует по меньшей мере два маркера истощения, например, коэкспрессирует PD-1 и LAG-3.);

(iv) уровень активности CD27 и/или CD45RO- (например, CD27+ CD45RO-) иммунных эффекторных клеток, например, в популяции CD4+ или CD8+ Т-клеток в образце (например, аферезном образце или образце продукта, произведенного CAR-экспрессирующей клеткой);

(v) уровень активности одного, двух, трех, четырех, пяти, десяти, двадцати или больше биомаркеров, выбранных из CCL20, IL-17a и/или IL-6, PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L, KLRG1;

(vi) уровень активности цитокинов (например, качества репертуара цитокинов) в образце продукта CAR-экспрессирующей клетки, например, образце продукта CLL-1-экспрессирующей клетки;

(vii) эффективность трансдукции CAR-экспрессирующей клетки в образце продукта, произведенного CAR-экспрессирующей клеткой.

В некоторых воплощениях любого из способов, раскрытых в настоящем описании, терапия CAR-экспрессирующими клетками включает множество (например, популяцию) CAR-экспрессирующих иммунных эффекторных клеток, например, множество (например, популяцию) Т-клеток или NK-клеток или их комбинацию. В одном воплощении терапия CAR-экспрессирующими клетками представляет собой терапию CLL-1-CAR.

В некоторых воплощениях любого из способов, раскрытых в настоящем описании, меру одного или нескольких (i)-(vii) получают из аферезного образца, взятого у субъекта. Аферезный образец можно оценить перед инфузией или реинфузией.

В некоторых воплощениях любого из способов, раскрытых в настоящем описании, меру одного или нескольких (i)-(vii) получают из образца продукта, произведенного CAR-экспрессирующей клеткой, например, образца продукта CLL-1-CAR-

экспрессирующей клетки. Продукт, произведенный CAR-экспрессирующей клеткой, можно оценить перед инфузией или реинфузией.

В некоторых воплощениях любого из способов, раскрытых в настоящем описании, оценивают состояние субъекта до получения, во время или после получения терапии CAR-экспрессирующими клетками.

В некоторых воплощениях любого из способов, раскрытых в настоящем описании, мера одного или нескольких (i)-(vii) оценивает профиль экспрессии одного или нескольких из генов, проточной цитометрии или экспрессии белка.

В некоторых воплощениях любого из способов, раскрытых в настоящем описании, способ дополнительно включает идентификацию субъекта как респондер, нереспондер, переносящего рецидив или непереносящего рецидив на основании меры одного или нескольких (i)-(vii).

В некоторых воплощениях любого из способов, раскрытых в настоящем описании, респондер (например, полный респондер) имеет или идентифицирован как имеющий более высокий уровень активности одного, двух или больше (всех) GZMK, PPF1BP2 или наивных Т-клеток, по сравнению с нереспондером.

В некоторых воплощениях любого из способов, раскрытых в настоящем описании, нереспондер имеет или идентифицирован как имеющий более высокий уровень активности одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи или больше (например, всех) из IL22, IL-2RA, IL-21, IRF8, IL8, CCL17, CCL22, эффекторных Т-клеток или регуляторных Т-клеток, по сравнению с респондером.

В некоторых воплощениях переживающий рецидив представляет собой пациента, имеющего, или пациента, который идентифицирован как имеющий, по сравнению с непереживающим рецидив, повышенный уровень экспрессии одного или нескольких (например, 2, 3, 4 или всех) из следующих генов: MIR199A1, MIR1203, uc021ovp, ITM2C и HLA-DQB1, и/или пониженные уровни экспрессии, по сравнению с непереживающим рецидив, одного или нескольких (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или всех) из следующих генов: PPIAL4D, TTTY10, TXLNG2P, MIR4650-1, KDM5D, USP9Y, PRKY, RPS4Y2, RPS4Y1, NCRNA00185, SULT1E1 и EIF1AY.

В некоторых воплощениях любого из способов, раскрытых в настоящем описании, полный респондер имеет или идентифицирован как имеющий, более высокий, например, статистически значимый более высокий, процент CD8+ Т-клеток по сравнению с эталонной величиной, например, процентом CD8+ Т-клеток у нереспондера.

В некоторых воплощениях любого из способов, раскрытых в настоящем описании, полный респондер имеет или идентифицирован как имеющий, более высокий, например, статистически значимый более высокий, процент CD27+ CD45RO- иммунных эффекторных клеток, например, в популяции CD8+, по сравнению с эталонной величиной, например, числом CD27+ CD45RO- иммунных эффекторных клеток у нереспондера.

В некоторых воплощениях любого из способов, раскрытых в настоящем описании, полный респондер или неполный респондер имеет или идентифицирован как имеющий, более высокий, например, статистически значимый более высокий, процент CD4+ Т-клеток по сравнению с эталонной величиной, например, процентом CD4+ Т-клеток у нереспондера.

В некоторых воплощениях любого из способов, раскрытых в настоящем описании, полный респондер имеет или идентифицирован как имеющий, более высокий процент одной, двух, трех или больше (например, всех) покоящихся T_{EFF}-клеток, покоящихся T_{REG}-клеток, молодых Т-клеток (например, молодых CD4 или CD8 клеток или гамма/

дельта Т-клеток) или ранних Т-клеток памяти или их комбинации по сравнению с эталонной величиной, например, числом покоящихся T_{EFF}-клеток, покоящихся T_{REG}-клеток, молодых Т-клеток (например, молодых CD4 или CD8 клеток) или ранних Т-клеток памяти у нереспондера.

В некоторых воплощениях любого из способов, раскрытых в настоящем описании, нереспондер имеет или идентифицирован как имеющий более высокий процент одной, двух, трех или больше (например, всех) активированных T_{EFF}-клеток, активированных T_{REG}-клеток, старых Т-клеток (например, старых CD4 или CD8 клеток) или поздних Т-клеток памяти или их комбинации по сравнению с эталонной величиной, например, числом активированных T_{EFF}-клеток, активированных T_{REG}-клеток, старых Т-клеток (например, старых CD4 или CD8 клеток) или поздних Т-клеток памяти у респондера.

В некоторых воплощениях любого из способов, раскрытых в настоящем описании, нереспондер имеет или идентифицирован как имеющий более высокий процент маркера истощения иммунных клеток, например, одного, двух или больше иммунных реперных ингибиторов (например, PD-1, PD-L1, TIM-3 и/или LAG-3). В одном воплощении нереспондер имеет или идентифицирован как имеющий более высокий процент PD-1, PD-L1, TIM-3 и/или LAG-3 экспрессирующих иммунных эффекторных клеток (например, CD4+ Т-клеток и/или CD8+ Т-клеток) (например, CAR-экспрессирующих CD4+ клеток и/или CD8+ Т-клеток) по сравнению с процентом PD-1 и/или LAG-3 экспрессирующих иммунных эффекторных клеток у респондера.

В одном воплощении нереспондаер имеет или идентифицирован как имеющий более высокий процент иммунных клеток, имеющих истощенный фенотип, например, иммунных клеток, которые коэкспрессируют по меньшей мере два маркера истощения, например, коэкспрессируют PD-1, PD-L1 и/или TIM-3. В других воплощениях нереспондаер имеет или идентифицирован как имеющий более высокий процент иммунных клеток, имеющих истощенный фенотип, например, иммунных клеток, которые коэкспрессируют по меньшей мере два маркера истощения, например, коэкспрессируют PD-1 и LAG-3.

В некоторых воплощениях любого из способов, раскрытых в настоящем описании, нереспондер имеет или идентифицирован как имеющий более высокий процент PD-1/PD-L1+/LAG-3+ в популяции CAR-экспрессирующих клеток (например, популяции CLL-1-CAR клеток) по сравнению с респондером (например, полным респондером) для терапии CAR-экспрессирующими клетками.

В некоторых воплощениях любого из способов, раскрытых в настоящем описании, неполный респондер имеет или идентифицирован как имеющий более высокий процент PD-1/PD-L1+/LAG-3+ клеток, чем респондер, в популяции CAR-экспрессирующих клеток (например, популяции CLL-1-CAR+ клеток).

В некоторых воплощениях любого из способов, раскрытых в настоящем описании, нереспондер имеет или идентифицирован как имеющий истощенный фенотип PD-1/PD-L1+/CAR+ и коэкспрессию LAG-3 в популяции CAR-экспрессирующих клеток (например, популяции CLL-1-CAR+ клеток).

В некоторых воплощениях любого из способов, раскрытых в настоящем описании, нереспондер имеет или идентифицирован как имеющий более высокий процент PD-1/PD-L1+/TIM-3+ клеток в популяции CAR-экспрессирующих клеток (например, популяции CLL-1-CAR+ клеток), по сравнению с респондером (например, полным респондером).

В некоторых воплощениях любого из способов, раскрытых в настоящем описании, неполный респондер имеет или идентифицирован как имеющий более высокий, чем

респондер, процент PD-1/PD-L1+/TIM-3+ клеток в популяции CAR-экспрессирующих клеток (например, популяции CLL-1-CAR+ клеток).

В некоторых воплощениях любого из способов, раскрытых в настоящем описании, присутствие CD8+ CD27+ CD45RO- Т-клеток в аферезном образце является положительным предсказанием реакции субъекта на терапию CAR-экспрессирующими клетками (например, терапию CLL-1-CAR).

В некоторых воплощениях любого из способов, раскрытых в настоящем описании, высокий процент PD1+ CAR+ и LAG3+ или TIM3+ Т-клеток в аферезном образце является плохим прогностическим предсказанием реакции субъекта на терапию CAR-экспрессирующими клетками (например, терапию CLL-1-CAR).

В некоторых воплощениях любого из способов, раскрытых в настоящем описании, респондер (например, полный или неполный респондер) имеет один, два, три или больше (или все) из следующих профилей:

(i) имеет большее число CD27+ иммунных эффекторных клеток по сравнению с эталонной величиной, например, числом CD27+ иммунных эффекторных клеток у нереспондера;

(ii) имеет большее число CD8+ Т-клеток по сравнению с эталонной величиной, например, числом CD8+ Т-клеток у нереспондера;

(iii) имеет меньшее число иммунных клеток, экспрессирующих один или несколько реперных ингибиторов, например, реперных ингибиторов, выбранных из PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3 или KLRG-1 или их комбинации, по сравнению с эталонной величиной, например, числом клеток, экспрессирующих один или несколько реперных ингибиторов, у нереспондера;

(iv) имеет большее число одной, двух, трех, четырех или больше (всех) покоящихся T_{EFF}-клеток, покоящихся T_{REG}-клеток, наивных CD4 клеток, нестимулированных клеток памяти или ранних Т-клеток памяти или их комбинации по сравнению с эталонной величиной, например, числом покоящихся T_{EFF}-клеток, покоящихся T_{REG}-клеток, наивных CD4 клеток, нестимулированных клеток памяти или ранних Т-клеток памяти у нереспондера.

В некоторых воплощениях любого из способов, раскрытых в настоящем описании, уровень цитокинов или активность (vi) выбирают для одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми или больше (или всех) цитокинов CCL20/MIP3a, IL17A, IL6, GM-CSF, IFN γ , IL10, IL13, IL2, IL21, IL4, IL5, IL9 или TNF α или их комбинации. Цитокин можно выбрать из одного, двух, трех, четырех или больше (или всех) цитокинов IL-17a, CCL20, IL2, IL6 или TNF α . В одном воплощении повышенный уровень или активность цитокина выбирают для одного или обоих из IL-17a и CCL20, и это является показателем повышенной чувствительности или сниженного рецидива.

В некоторых воплощениях любого из способов, раскрытых в настоящем описании, эффективность трансдукции в (vii) 15% или выше является показателем повышенной чувствительности или сниженного рецидива.

В некоторых воплощениях любого из способов, раскрытых в настоящем описании, эффективность трансдукции в (vii) 15% или ниже является показателем пониженной чувствительности или повышенного рецидива.

В воплощениях респондера, нереспондера, переживающего рецидив или непереживающего рецидив, идентифицированного способами по настоящему изобретению, можно дополнительно оценить согласно клиническим критериям. Например, полный респондер представляет собой или идентифицирован как субъект, имеющий заболевание, например, рак, который показывает завершённую реакцию,

например, полную ремиссию, на лечение. Завершенную реакцию можно идентифицировать, например, с использованием NCCN Guidelines® или по Cheson et al., J. Clin. Oncol., 17: 1244 (1999); и Cheson et al., «Revised Response Criteria for Malignant Lymphoma», J. Clin. Oncol., 25: 579-586 (2007) (обе работы полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок), как описано в настоящем описании. Неполный респондер представляет собой или идентифицирован как субъект, имеющий заболевание, например, рак, который показывает частичную реакцию, например, частичную ремиссию, на лечение. Частичную ремиссию можно идентифицировать, например, с использованием NCCN Guidelines® или критерия Cheson, как описано в настоящем описании. Нереспондер представляет собой или идентифицирован как субъект, имеющий заболевание, например, рак, который не показывает реакцию на лечение, например, пациент имеет стабильное заболевание или прогрессирующее заболевание. Нереспондер может быть идентифицирован, например, с использованием NCCN Guidelines® или критерия Cheson, как описано в настоящем описании.

Альтернативно или в комбинации со способами, раскрытыми в настоящем описании, чувствительными к указанной величине, выполняют одно, два, три, четыре или больше действий из

назначения, например, респондеру или нереспондеру терапии CAR-экспрессирующими клетками;

введения изменных доз при терапии CAR-экспрессирующими клетками; изменения схемы или длительности курса терапии CAR-экспрессирующими клетками; введения, например, нереспондеру или неполному респондеру дополнительного средства в комбинации с терапией CAR-экспрессирующими клетками, например, реперного ингибитора, например, реперного ингибитора, описанного в настоящем описании;

назначения нереспондеру или неполному респондеру терапии, которая повышает число молодых Т-клеток у субъекта перед лечением терапией CAR-экспрессирующими клетками;

модификации процесса производства терапии CAR-экспрессирующими клетками, например, обогащая молодыми Т-клетками перед введением нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, или повышая эффективность трансдукции, например, у субъекта, идентифицированного как нереспондер или неполный респондер;

назначения альтернативной терапии, например, для нереспондера или неполного респондера или переживающего рецидив; или

если субъект представляет собой или идентифицирован как нереспондер или переживающий рецидив, снижения популяции Т-клеток и/или сигнатуры гена T_{REG}, например, путем одного или нескольких действий из истощения CD25, введения циклофосфамида, анти-GITR антитела или их комбинации.

В некоторых воплощениях субъекта предварительно лечат анти-GITR антителами. В некоторых воплощениях субъекта лечат анти-GITR антителами перед инфузией или реинфузией.

Способы доставки биополимеров

В некоторых воплощениях одну или несколько CAR-экспрессирующих клеток, описанных в настоящем описании, можно вводить или доставлять субъекту через биополимерный каркас, например, биополимерный имплантат. Биополимерные каркасы могут поддерживать или усиливать доставку, экспансию и/или рассредоточение CAR-экспрессирующих клеток, описанных в настоящем описании. Биополимерный каркас включает биосовместимый (например, по существу не вызывающий воспалительной

или иммунной реакции) и/или биоразлагаемый полимер, который может встречаться в природе или быть синтетическим.

Примеры подходящих биополимеров включают, но не ограничиваются перечисленным, агар, агарозу, альгинат, смесь альгинат/кальцийфосфатный цемент (CPC), бета-галактозидазу (β -GAL), (1,2,3,4,6-пентаацетил- α -D-галактозу), целлюлозу, хитин, хитозан, коллаген, эластин, желатин, гиалуроновую кислоту-коллаген, гидроксиапатит, сополимер 3-гидроксibuтирата и 3-гидроксигексаноата (PHBPPx), полилактид, поликапролактон (PCL), сополимер лактида и гликолида (PLG), полиэтиленоксид (ПЭО), сополимер молочной и гликолевой кислот (PLCA), полипропиленоксид (ППО), поливиниловый спирт (ПВС), шелк, соевый белок и изолят соевого белка, одни или в комбинации с любой другой полимерной композицией в любой концентрации и в любом соотношении. Биополимер может быть дополнен или модифицирован молекулами, промотирующими адгезию или миграцию, например, коллагенимирующими пептидами, которые связываются с коллагеновым рецептором лимфоцитов, и/или подобными молекулами, которые усиливают доставку, экспансию или функцию, например, противораковую активность клеток, которые доставляются. Биополимерный каркас может быть инъектируемым, например, гелем или полутвердым веществом, или представлять собой твердую композицию.

В некоторых воплощениях CAR-экспрессирующие клетки, описанные в настоящем описании, высевает на биополимерный каркас перед доставкой субъекту. В воплощениях биополимерный каркас дополнительно включает одно или два дополнительных терапевтических средства, описанных в настоящем описании (например, другую CAR-экспрессирующую клетку, антитело или малую молекулу), или средства, которые усиливают активность CAR-экспрессирующей клетки, например, внедренной или конъюгированной с биополимерами каркаса. В воплощениях биополимерный каркас инъектируют, например, внутритухолово, или хирургически имплантируют в опухоль или достаточно близко к опухоли, для опосредования противоопухолевого действия. Другие примеры биополимерных композиций и способов их доставки описаны в Stephan et al., *Nature Biotechnology*, 2015, 33: 97-101; и WO2014/110591.

30 **Фармацевтические композиции и лечение**

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут включать CAR-экспрессирующую клетку, например, множество CAR-экспрессирующих клеток, как описано в настоящем описании, в комбинации с одним или несколькими фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или эксципиентами. Такие воплощения могут включать забуференный физиологический раствор, забуференный фосфатом физиологический раствор и т.п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатообразующие агенты, такие как ЭДТК или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия) и консерванты. Композиции по настоящему изобретению в одном аспекте получают для внутривенного введения.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить способом, подходящим для заболевания, от которого лечат (или которое предупреждают). Количество композиции и частота введения будут определяться такими факторами, как состояние пациента и тип и тяжесть заболевания пациента, хотя соответствующие дозировки можно определить клиническими испытаниями.

В одном воплощении фармацевтическая композиция по существу свободна, например, не имеется детектируемых уровней примеси, например, выбранной из группы,

включающей эндотоксин, микоплазму, репликационно-компетентный лентивирус (RCL), р24, VSV-G нуклеиновую кислоту, ВИЧ gag, остаточные гранулы, покрытые анти-CD3/анти-CD28, мышинные антитела, собранную сыворотку человека, бычий сывороточный альбумин, сыворотку коровы, компоненты культуральных сред, компоненты клетки, пакующей вектор, или плазмиды, бактерии и грибы. В одном воплощении бактерия представляет собой по меньшей мере один вид, выбранный из группы, включающей *Alcaligenes faecalis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenza*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia* и *Streptococcus pyogenes* группы А.

Когда указывается «иммунологически эффективное количество», «противораковое эффективное количество», «опухольингибирующее эффективное количество» или «терапевтическое количество», точное количество вводимых композиций по настоящему изобретению может определить врач с учетом индивидуальных отличий в возрасте, массе, размере опухоли, степени заражения или метастазирования и состояния пациента (субъекта). Как правило, можно установить, что фармацевтическую композицию, включающую Т-клетки, описанные в настоящем описании, можно вводить в дозировке 10^4 - 10^9 клетки/кг массы тела, в некоторых случаях 10^5 - 10^6 клетки/кг массы тела, включая все целые величины в указанных интервалах. Композиции с Т-клетками также можно вводить несколько раз в таких дозировках. Клетки можно вводить, используя методы инфузии, которые обычно известны в иммунотерапии (см., например Rosenberg et al., New Eng. J. of Med., 319: 1676, 1988).

В некоторых аспектах может быть желательно введение субъекту активированных Т-клеток и затем по существу повторно взять кровь (или иметь выполненный аферез), активировать Т-клетки из нее согласно настоящему изобретению и реинфузировать пациенту такими активированными и выращенными Т-клетками. Такой процесс можно выполнять несколько раз каждые несколько недель. В некоторых аспектах можно активировать Т-клетки из вытяжек крови от 10 см³ до 400 см³. В некоторых аспектах Т-клетки активируют из вытяжек крови 20 см³, 30 см³, 40 см³, 50 см³, 60 см³, 70 см³, 80 см³, 90 см³ или 100 см³.

Введение композиций субъекту можно выполнить любым удобным способом, включая аэрозольную ингаляцию, инъекцию, проглатывание, трансфузию, имплантацию или трансплантацию. Композиции, описанные в настоящем изобретении, можно вводить пациенту трансартериально, подкожно, интрадермально, внутриопухолево, интранодулярно, интрамедулярно, внутримышечно, внутривенной (i.v.) инъекцией или интраперитонеально. В одном аспекте композиции Т-клеток по настоящему изобретению вводят пациенту интрадермальной или подкожной инъекцией. В одном аспекте композиции CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток или NK-клеток) по настоящему изобретению вводят i.v. инъекцией. Композиции CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток или NK-клеток) можно инъектировать непосредственно в опухоль, лимфоузел или место заражения.

В примере определенного аспекта субъекты могут подвергаться лейкоферезу, когда лейкоциты собирают, обогащают или деплетируют ex vivo для селекции и/или выделения интересующих клеток, например, иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток или NK-клеток). Такие изоляты иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток или NK-клеток) можно размножить способами, известными в технике, и обработать так, что можно ввести одну или несколько конструкций CAR по изобретению, причем посредством этого создают CAR-экспрессирующую клетку (например, CAR-Т-клетку

или CAR-экспрессирующую NK-клетку) по изобретению. Затем субъектов, нуждающихся в этом, подвергают стандартному лечению высокой дозой химиотерапии с последующей трансплантацией стволовых клеток периферической крови. В некоторых аспектах после или одновременно с трансплантатом субъекты получают инфузию размноженных CAR-экспрессирующих клеток (например, CAR-T-клеток или CAR-экспрессирующих NK-клеток) по настоящему изобретению. В другом аспекте выращенные клетки вводят перед последующей операцией.

Дозировка при вышеуказанных лечених, вводимая пациенту, будет изменяться в связи с точной природой состояния, от которого лечат, и реципиента лечения. Изменение размера дозировки для введения человеку можно выполнить согласно практике, установленной в технике. Доза в случае САМРАТН, например, как правило, будет находиться в интервале 1 - примерно 100 мг для взрослого пациента, вводимая обычно ежедневно в течение периода от 1 до 30 дней. Предпочтительная суточная доза составляет 1-10 мг в день, хотя в некоторых случаях могут использоваться большие дозы до 40 мг в день (описано в патенте США № 6120766).

В одном воплощении CAR внедряют в иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки или NK-клетки), например, с использованием транскрипции *in vitro*, и субъект (например, человек) получает начальное введение CAR-экспрессирующих иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток, NK-клеток) по изобретению и одно или два последующих введения CAR-экспрессирующих иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток, NK-клеток) по изобретению, причем одно или два последующих введения назначают менее, чем через 15 дней, например, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 дня после предыдущего введения. В одном воплощении субъекту (например, человеку) назначают более одного введения CAR-экспрессирующих иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток, NK-клеток) по изобретению в неделю, например, 2, 3 или 4 введения CAR-экспрессирующих иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток, NK-клеток) по изобретению в неделю. В одном воплощении субъект (например, человек) получает более одного введения CAR-экспрессирующих иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток, NK-клеток) по изобретению в неделю (например, 2, 3 или 4 введения в неделю) (также называемого в настоящем описании циклом) с последующими недельными введениями CAR-экспрессирующих иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток, NK-клеток), и затем субъекту назначают одно или несколько дополнительных введений CAR-экспрессирующих иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток, NK-клеток) (например, более одного введения CAR-экспрессирующих иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток, NK-клеток) в неделю). В другом воплощении субъект (например, человек) получает более одного цикла CAR-экспрессирующих иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток, NK-клеток), и время между каждым циклом составляет менее 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 дней. В одном воплощении CAR-экспрессирующие иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки, NK-клетки) вводят через день 3 введения в неделю. В одном воплощении CAR-экспрессирующие иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки, NK-клетки) по изобретению вводят в течение по меньшей мере двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми или более недель.

В одном аспекте CLL-1-CAR-экспрессирующие клетки, например, CLL-1-CART или CLL-1-CAR-экспрессирующие NK-клетки, получают с использованием лентивирусных векторов, таких как лентивирус. Получают CAR-экспрессирующие клетки, например, CLL-1-CART или CLL-1-CAR-экспрессирующие NK-клетки, которые будут иметь стабильную экспрессию CAR.

В одном аспекте CAR-экспрессирующие клетки, например, CART или CAR-экспрессирующие НК-клетки, получают с использованием вирусного вектора, такого как гамма-ретровирусный вектор, например, гамма-ретровирусный вектор, описанный в настоящем описании. С использованием таких векторов получают CAR-экспрессирующие клетки, например, CART или CAR-экспрессирующие НК-клетки, которые будут иметь стабильную экспрессию CAR.

В одном аспекте CAR-экспрессирующие клетки, например, CART или CAR-экспрессирующие НК-клетки, временно экспрессируют CAR-векторы в течение 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 дней после трансдукции. Временная экспрессия CAR может быть эффективна за счет доставки РНК CAR-вектора. В одном аспекте CAR РНК транскрибируют в Т-клетку электропорацией.

Возможной проблемой, которая может возникнуть у пациентов, которых лечат с использованием временно экспрессирующих CAR-экспрессирующих клеток, например, CART или CAR-экспрессирующих НК-клеток (в особенности с CART, имеющим мышинный scFv), является анафилаксия после нескольких лечений.

Без связи с такой теорией, полагают, что такая анафилактическая реакция может вызываться за счет развития у пациента гуморальной анти-CAR реакции, т.е., анти-CAR антител, имеющих изотип анти-IgE. Полагают, что клетки пациента, продуцирующие антитела, претерпевают смещение класса от изотипа IgG (который не вызывает анафилаксию) к изотипу IgE, когда имеется десяти-четырнадцатидневная пауза в воздействии на антиген.

Если у пациента имеется высокий риск образования реакции на анти-CAR антитела по ходу лечения терапией CAR (таких, какие образуются путем трансдукции РНК), перерывы в инфузии CART не должны длиться более десяти-четырнадцати дней.

Примеры

Изобретение описано с дополнительными подробностями путем обращения к следующим далее экспериментальным примерам. Такие примеры предлагаются только в целях пояснения и не предназначены для ограничения, если конкретно не указано иное. Таким образом, изобретение не должно никоим образом рассматриваться как ограниченное последующими примерами, а должно рассматриваться как охватывающее любые и все варианты, которые становятся очевидными в результате указаний, приведенных в настоящем описании.

Без дополнительного описания предполагается, что специалист в данной области техники может с использованием предшествующего описания и последующих пояснительных примеров получить и использовать соединения по настоящему изобретению и осуществить на практике заявленные способы. Следующие далее рабочие примеры конкретно указывают на различные аспекты настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие каким-либо образом остальную часть раскрытия.

Пример 1. Получение конструкций CAR

Получают полные человеческие анти-CD33 одноцепочечные варибельные фрагменты (scFv) и клонируют в лентивирусный экспрессирующий вектор с цепью внутриклеточного CD3-дзета и внутриклеточным костимулирующим доменом 4-1BB, и дают названия, приведенные в таблице 1 (которая показана в разделе «Подробное описание»).

Порядок, в котором домены VH и VL появляются в scFv, изменяют (т.е., ориентация VL-VH или VH-VL), и где или три или четыре копии субъединицы «G4S» (SEQ ID NO: 25), где каждая субъединица включает последовательность GGGGS (SEQ ID NO: 25) (например, (G4S)₃ (SEQ ID NO: 28) или (G4S)₄ (SEQ ID NO: 27)), соединяют варибельные

домены с образованием частицы домена scFv, как показано в таблице 2.

Последовательности фрагментов scFv человека (SEQ ID NO: 39-51) приводятся в настоящем описании в таблице 2 (в разделе «Подробное описание»). Указанные клоны все содержат замену остатка Q/K в сигнальном домене костимулирующего домена, полученного из цепи CD3-дзета. Затем фрагменты CAR scFv клонируют в лентивирусные векторы для создания полноразмерной конструкции CAR в сигнальной кодирующей рамке, и используя промотор EF1-альфа для экспрессии (SEQ ID NO: 11).

Последовательности конструкций CAR и последовательности их доменов перечислены в разделе «Подробное описание». Анализ конструкций CAR человека проводят так, как описано в примерах 2-5.

Пример 2. Анализ и активность in vitro scFv человека, содержащего CART

Анти-CLL-1-CAR конструкции оценивают на активность с использованием линии клеток Юкарта, содержащей люциферазный репортер, полученный с помощью промотора NFAT (названы клетками JNL). Активность CAR измеряют как активацию такого NFAT-полученного репортера. Лентивирусные супернатанты, содержащие конструкции CART, добавляют к клеткам JNL для трансдукции. Через 4-6 дней после трансдукции клетки JNL оценивают на экспрессию CAR FACS, как описано ниже (фиг. 2A, 2B и 2C), или смешивают с мишень-положительными (PL21, THP1, HL60, U937) или мишень-отрицательными (K562) клеточными линиями в указанном отношении эффектора (JNL) к клеточной линии-мишени (Е:Т) для запуска активации. После 20-часовой совместной инкубации измеряют люциферазный сигнал с использованием люциферазного анализа Bright-Glo™ Luciferase Assay на приборе EnVision (фиг. 1A, 1B и 2C).

Оптимальные анти-CLL-1-CAR конструкции отбирают на основании количества и качества эффекторных Т-клеточных реакций CLL-1-CAR-трансдуцированных Т-клеток («CART-CLL-1» или «CART-CLL-1 Т-клеток») в ответ на CLL-1-экспрессирующие («CLL-1+») мишени. Эффекторные Т-клеточные реакции включают, но не ограничиваются перечисленным, экспансию, пролиферацию, удвоение, продуцирование цитокинов и киллинг клеток-мишеней или цитолитическую активность (дегрануляцию).

Генерация CART-CLL-1

Человеческий scFv, кодирующий лентивирусные трансферные векторы, используют для получения геномного материала, упакованного в VSV псевдотипированные лентивирусные частицы. ДНК лентивирусного трансферного вектора смешивают с тремя пакующими компонентами VSVg, gag/pol и rev в комбинации с реагентом липофектамина для их трансфекции вместе в клетках Lenti-X 293T (Clontech).

Через 30 часов среды собирают, фильтруют и хранят при -80°C. Терапевтические CART-CLL-1 получают, исходя из крови здорового аферезного донора, чьи naive Т-клетки получают отрицательной селекцией в отношении Т-клеток, CD4+ и CD8+ лимфоцитов. Такие клетки активируют гранулами CD3×28 Dynabeads® Human T-Expander (CD3/CD28, Invitrogen) в отношении 1:3 в RPMI 1640, 10% инактивированной нагреванием фетальной телячьей сыворотки (FCS), 2 mM L-глутамин, 1× пенициллина/стрептомицина, 100 мкМ заменимых аминокислот, 1 mM пирувата Na, 10 mM HEPES и 55 мкМ 2-меркаптоэтанол, при 37°C, 5% CO₂. Т-Клетки культивируют при 1×10⁶ Т-клеток в 0,5 мл среды на лунку 24-луночного планшета. Через 24 часа Т-клетки дробятся, и добавляют 0,5 мл вирусного супернатанта. Т-Клетки начинают делиться по логарифмическому типу роста, который контролируют, измеряя число клеток на мл, и Т-клетки разбавляют свежей средой каждые два дня. Когда Т-клетки начинают оставаться без изменений приблизительно через 10 дней, логарифмический рост

ослабевает. Комбинация замедления скорости роста и объема Т-клеток, приближающегося к ~300 фл, определяет состояние Т-клеток для криоконсервации для дальнейших анализов.

Перед криоконсервацией определяют процент трансдуцированных клеток (экспрессирующих анти-CLL-1-CAR на клеточной поверхности) и их относительную интенсивность флуоресценции экспрессии анализом методом проточной цитометрии на BD LSRFortessa или BD-FACSCanto с использованием или белка L (фиг. 3А и 22А) или биотинилированного рекомбинантного человеческого белка CLL-1 как реагентов детекции (фиг. 3В и 22В). Строят гистограммы относительной интенсивности флуоресценции, из которых FACS показывает процент трансдуцированных Т-клеток. Результат трансдукции в интервале CART положительных клеток 10-50%.

Оценка цитолитической активности и секреции цитокинов CART-CLL-1 перенаправленных Т-клеток

Для того, чтобы оценить способности CART-CLL-1 Т-клеток к уничтожению и секреции цитокинов, клетки оттаивают и оставляют на ночь для восстановления.

Киллинг Т-клетками направлен на CLL-1-экспрессирующие клеточные линии острого миелоидного лейкоза PL21 (фиг. 4А) и HL-60 (фиг. 4В), стабильно экспрессирующие люциферазу. Неэкспрессирующие CLL-1 клетки U87 используют в качестве контроля (фиг. 4С), и нетрансдуцированные Т-клетки используют для определения фоновых уровней неспецифического киллинга. Цитолитическую активность CART-CLL-1 определяют в виде титрования отношений эффектор:клетка-мишень 10:1 и 3-кратных разведений по нисходящей Т-клеток, где эффекторные клетки определяют как Т-клетки, экспрессирующие анти-CLL-1 химерный рецептор. Через 20 часов измеряют люциферазный сигнал с использованием люциферазного анализа Bright-Glo™ на приборе EnVision.

Сравнение таких кривых киллинга, титрование количества эффекторных клеток показывает, что эти экспрессирующие CLL-1 клетки разрушаются. Т-Клетки от того же донора, которые трансдуцированы любыми CAR-CLL-1-клетками, имеющими человеческий scFv, способны селективно убивать CLL-1+ мишени. Представляет интерес, что активны не все клетки CART-CLL-1. Клетки CART, содержащие клон 13, в таком анализе неактивны даже в присутствии мишень-экспрессирующих клеток.

Для измерения продуцирования цитокинов клетками CART-CLL-1 клетки оттаивают и оставляют на ночь для восстановления. Нетрансдуцированные Т-клетки (UTD) используют в качестве неспецифического контроля за фоновыми эффектами Т-клеток. Т-Клетки направлены на клетки HL-60, PL21 или U87. Выполняют анализ отношения эффектор:мишень 1:1 или 10:1, как отмечалось, где эффекторы определяют как Т-клетки, экспрессирующие анти-CLL-1-CAR. Анализ проводят через 24 часа после смешивания клеток, когда среды удаляют для анализа цитокинов TNF-альфа (фиг. 5А), IL-2 (фиг. 5В) и INF-гамма (фиг. 5С), с использованием набора CBA-Flex для детекции цитокинов человека.

Когда клетки культивируют с раковыми клетками, эндогенно экспрессирующими CLL-1, все CLL-1-CART, за исключением CLL-1-13, продуцируют цитокины в ответ на мишень-экспрессирующие клетки. Различие в реакционной способности различных клонов CLL-1-CART в отношении слвбо CLL-1-экспрессирующих клеток-мишеней может объяснить более хорошую клиническую эффективность CART клеток, трансдуцированных такими конструкциями.

Оценка пролиферативной способности CART-CLL-1

CART-CLL-1 Т-клетки проверяют на их способность к пролиферации в ответ на

воздействие антигена на клетках-мишенях. Проверяют несколько конструкций CLL-1-CAR - CLL-6, CLL-9, CLL-10, CLL-11, CLL-12 и CLL-13. Клетки-мишени включают клетки U937, PL-21, HL60 и Molm13. В день анализа (день 0) клетки-мишени считают и переносят в 50-мл пробирку в 6 мл Т-клеточных сред при 3×10^6 клетки/мл. Клетки-мишени облучают на льду 10000 рад. После облучения клетки-мишени дважды промывают в Т-клеточных средах, считают и ресуспендируют до 5×10^5 клетки/мл в клеточных средах на льду.

Замороженные трансдуцированные Т-клетки оттаивают, промывают в 10 мл полной Т-клеточной среды, центрифугируют при 300g в течение 10 мин и аккуратно ресуспендируют в 3 мл полной Т-клеточной среды при RT. Затем Т-клетки считают в Cellometer и ресуспендируют до $2,5 \times 10^6$ /мл в 10 мл среды. В 96-луночном планшете с лунками с U-образным дном комбинируют 25000 облученных клеток-мишеней и 25000 трансдуцированных CAR Т-клеток (отношение 1:1) в лунках при двукратном повторе. В отдельной лунке к 25000 трансдуцированных Т-клеток добавляют 75000 анти-CD3/CD28 гранул в 100 мкл среды для создания отношения клетки-к-гранулам 1:3 как положительного контроля; в другой лунке к 25000 трансдуцированных Т-клеток добавляют 100 мкл одной среды как контроль только среда. Клетки инкубируют в течение 4 суток при 37°C, 5% CO₂.

В день 4 клетки харвестируют, и дубликаты объединяют пипетированием и переносом в одну и ту же лунку на планшете с лунками с U-образным дном для окрашивания для FACS CD4, CD8 и CAR с использованием белка L или рекомбинантного белка CLL1 человека. После окрашивания клетки ресуспендируют в 120 мкл буфера MACS+0,5% BSA, и в каждую лунку добавляют 20 мкл/лунка контросветляющих гранул. Пролиферацию измеряют как число FACS положительных клеток, детектированных за период времени, используемый для подсчета 2500 гранул.

Как видно на фигурах 23А и 23В, клетки, экспрессирующие конструкции CLL-1-CAR CLL-6, CLL-9, CLL-10, CLL-11 и CLL-12, пролиферируют в присутствии различных клеток-мишеней.

Пример 3. Исследования токсичности CLL-1

CLL-1 измеряют проточной цитометрией с использованием коммерчески доступного антитела (клон HIM3-3, eBioscience). Результаты в настоящем описании показывают, что CLL-1 экспрессируется в большинстве первичных образцов от пациентов с AML (AML бласты не выпускают с использованием характеристик бокового рассеяния малых CD45dim) (фиг. 6).

Т-Клетки от двух различных доноров трансдуцируют CLL-1 (фиг. 6), и получают эффективность трансдукции 35-45%. Т-Клетки сначала стимулируют CD3/CD28 Dynabeads (Invitrogen) и поддерживают в средах, свободных от Т-клеток, вместе с носителем IL-2. Затем на следующий день Т-клетки трансдуцируют CLL-1 (фиг. 6) CAR с использованием лентивирусного вектора и размножают в средах в течение примерно 10 дней. Затем Т-клетки замораживают, когда средний объем клеток приблизится к 300 фл. Экспрессию CAR на Т-клетках детектируют проточной цитометрией с использованием биотинилированного белка CLL-1 (Sino Biological) с вторичным окрашиванием с использованием стрептавидина. Результаты, представленные в настоящем описании, показывают эффективность трансдукции Т-клеток, трансдуцированных CAR (фиг. 7А и 7В).

Клетки CART123, CLL1-CART и нетрансдуцированные Т-клетки инкубируют с клеточной линией CD123+/CLL1+ THP-1, двумя первичными образцами AML, которые представляют собой CLL1+/CD123+, и контрольной клеточной линией ALL NALM6 в течение 4 часов. Дегрануляцию CD107a измеряют проточной цитометрией (8А). CLL-1

CART клетки подвергают специфической дегрануляции THP1 и первичные образцы AML, но не контрольную клеточную линию (фиг. 8B). Результаты, представленные в настоящем описании, показывают, что клетки CLL1-CART подвергают специфической дегрануляции клеточные линии CLL1+ и первичные образцы AML.

5 Клетки CART123, CLL1-CART и нетрансдуцированные Т-клетки инкубируют с клеточной линией CD123+/CLL1+ THP-1, двумя первичными образцами AML, которые представляют собой CLL1+/CD123+, и контрольной клеточной линией ALL NALM6 в течение 4 часов. Затем клетки harvestируют, и интрацитоплазматический TNF α измеряют проточной цитометрией. Большая часть клеток CLL-1 CART продуцирует TNF- α после
10 инкубации специфически с THP1 и первичными образцами AML, а не с контрольной клеточной линией. Результаты, представленные в настоящем описании, показывают, что клетки CLL1-CART продуцируют TNF- α после инкубации с клеточной линией CLL1+ и первичными образцами AML (фиг. 9A и 9B).

Клетки CART123, CLL1-CART и нетрансдуцированные Т-клетки инкубируют с
15 клеточной линией CD123+/CLL1+ THP-1, двумя первичными образцами AML, которые представляют собой CLL1+/CD123+, и контрольной клеточной линией ALL NALM6 в течение 4 часов. Интрацитоплазматический IL-2 измеряют проточной цитометрией. Большая часть клеток CLL-1 CART продуцирует IL-2 после инкубации специфически с THP1 и первичными образцами AML, а не с контрольной клеточной линией. Результаты,
20 представленные в настоящем описании, показывают, что клетки CLL1-CART продуцируют IL-2 после инкубации с клеточной линией CLL1+ и первичными образцами AML (фиг. 10A и 10B).

Клетки CART123, CLL1-CART и нетрансдуцированные Т-клетки инкубируют с клеточными линиями CD123+/CLL1+ THP-1 и MOLM14, первичным образцом AML,
25 который представляют собой CLL1+/CD123+, и контрольной клеточной линией лимфомы из клеток мантии JEKO в течение 24 часов. Затем клетки harvestируют, и добавляют 7-AAD и гранулы для подсчета. Затем определяют киллинг с использованием анализа на основе проточной цитометрии после мечения CFSE опухолевых клеток (см., например, Cao et al., Cytometry, Part A, 2010; 7&A: 534-545) или путем инкубации CART клеток с
30 экспрессирующими люциферазу клетками-мишенями при различных соотношениях эффектор-к-мишени в течение до 20 часов, с последующей оптической визуализацией фотонов, испускаемых клетками-мишенями. В таком последнем анализе число живых клеток-мишеней коррелирует с числом испускаемых фотонов. Клетки CLL1-CART приводят к специфическому лизису MOLM14 (фиг. 11D), THP-1 (фиг. 11A) и первичного
35 образца AML (фиг. 11B), а не контрольной клеточной линии JEKO (фиг. 11C), при указанных соотношениях Е:Т. Результаты, представленные в настоящем описании, показывают, что клетки CLL1-CART специфически убивают клеточные линии CLL-1+ MOLM14 и THP-1 и первичные образцы AML (фиг. 11A-11D).

Пролиферацию клеток CART123, CART33 и CLL1-CART измеряют в реакции на
40 MOLM14, THP-1 и два первичных образца AML. Т-Клетки метят CFSE и инкубируют с мишенями в течение 120 часов при отношении эффектор:мишень 1:1. Клетки CLL1-CART претерпевают специфическую пролиферацию в ответ на MOLM14, THP-1 и первичные образцы AML. Непролиферирующие Т-клетки сохраняют один четкий пик экспрессии CFSE (по зеленой флуоресценции в канале FTTC), в то время как
45 пролиферирующие клетки CART имеют более одного пика CFSE и экспрессию, которая ниже базовой линии. Результаты, представленные в настоящем описании, показывают, что клетки CLL1-CART пролиферируют в ответ на MOLM14, THP-1 и первичные образцы AML (фиг. 12A и 12B).

Фигура 13 представляет схематическую диаграмму анализа токсичности кроветворных стволовых клеток CLL1-CART с использованием аутологичных трансплантатов. Мыши NSGS (NOD-SCID-гамма мыши, трансгенные для IL-3, GM-CSF, фактора стволовых клеток) получают бусульфан i.p. и затем, на следующий день, Т-клетки, извлеченные из костного мозга здорового донора. Приживление подтверждают анализом проточной цитометрией периферической крови через 4 недели и определяют как CD45 положительные клетки в кровотоке, которых >1%. Затем мышей обрабатывают аутологичными Т-клетками внутривенной инъекцией в хвостовую вену. Получают Т-клетки от того же донора и трансдуцируют CART33, CLL-1-CAR или UTD. Четвертая группа не получает обработку. Затем у мышей берут ретроорбитальную кровь в день 7, день 14 и день 21.

Экспрессию CLL-1 измеряют на различных клетках периферической крови из гуманизированных ксенотрансплантатов. У мышей берут кровь из ретроорбитальной вены после анестезии с использованием стандартных методов. Затем стандартный объем крови 50-60 мкл лизируют в 1 мл буфера для лизиса АСК. Затем кровь окрашивают с использованием флуоресцентно меченных антител, и определяют экспрессию CLL-1 на различных клетках периферической крови с использованием проточной цитометрии. Такой анализ выполняют как базовый после приживления обедненного Т-клетками костного мозга здорового донора и перед любыми обработками. Показаны характерные схемы FACS анализа периферической крови мыши (фиг. 14A). CLL-1 экспрессируется на моноцитах (CD14+ клетки) или Т-клетках (CD3+ клетки). Показана характерная гистограмма (фиг. 14B). Показано схематическое представление анализа периферической крови от 24 мышей (фиг. 14C). Результаты, представленные в настоящем описании, показывают, что CLL-1 экспрессируется на различных линиях миелоидных клеток и В-клетках у гуманизированной мыши.

Токсичность кроветворных стволовых клеток CLL-1-CART определяют с использованием аутологичной модели. Приводится характерная схема анализа периферической крови методом проточной цитометрии. Обработка клеток CART33 или CLL10CART приводит к существенному снижению числа миелоидных клеток (CD123+, CD33+, CLL1+) и CD14+ моноцитов. Результаты, представленные в настоящем описании, показывают, что CLL-1 экспрессируется на различных линиях миелоидных клеток и В-клетках у гуманизированной мыши.

Анализируют экспрессию CLL-1 на различных клетках-предшественниках костного мозга из гуманизированных ксенотрансплантатов. После 4 недель обработки Т-клетками мышей умерщвляют, и костный мозг собирают и анализируют. Костный мозг собирают промывкой бедренных костей. Образцы костного мозга от контрольных необработанных животных используют как эталон для анализа экспрессии CLL-1 на клетках-предшественниках. Затем образцы окрашивают с использованием флуоресцентно меченных антител, и определяют экспрессию CLL-1 на различных клетках-предшественниках с использованием проточной цитометрии. CLL-1 экспрессируется на CD34+CD38+ кроветворных стволовых клетках, CD123 bright, CD123dim и CD33 положительных клетках. Закрывают CD45^{dim}, LIN⁻, живые клетки. Результаты, представленные в настоящем описании, показывают, что CLL-1 экспрессируется на различных миелоидных клетках-предшественниках и кроветворных стволовых клетках у гуманизированных мышей (фиг. 16A-16D).

Фигура 17 представляет схематическую диаграмму анализа токсичности кроветворных стволовых клеток CLL-1-CART клеток с использованием ксенотрансплантатов гуманизированной иммунной системы (HIS). У мышей HIS берут

ретроорбитально кровь через 6-8 недель после инъекции CD34+ (клеток) плодной печени, подтверждают приживление клеток человека и затем обрабатывают любыми из CLL1-CART, CART123, CART33-CD8 шарнира, CART33-IgG4 шарнира, нетрансдуцированных Т-клеток или не обрабатывают. Затем у мышей еженедельно
 5 берут ретроорбитально кровь. Затем мышей умервщляют в день 28, и органы собирают и анализируют.

Костный мозг анализируют через 4 недели после инфузии Т-клеток. Токсичность кроветворных стволовых клеток CLL-1-CART клеток оценивают с использованием ксенотрансплантатов HIS. Мышей умервщляют через 4 недели после инфузии Т-клеток,
 10 бедренные кости собирают и промывают для получения костного мозга. Затем образцы окрашивают с использованием флуоресцентно меченных антител. Отображают схематично всех мышей, обработанных различными CART клетками. Обработка CLL-1-CART приводит к существенному снижению CD34+CD38- компонента (кроветворные стволовые клетки) (фиг. 18А) и CD34+CD38+ компонента (клетки-предшественники)
 15 (фиг. 18В). Показаны характерные отображения костного мозга мышей, обработанных различными CART клетками. Закрыты живые CD45dim LIN- клетки (фиг. 19А-19Е).

Костный мозг мышей HIS анализируют через 4 недели после инфузии Т-клеток. Токсичность кроветворных стволовых клеток оценивают с использованием ксенотрансплантатов HIS. Мышей умервщляют через 4 недели после инфузии Т-клеток,
 20 бедренные кости собирают и промывают для получения костного мозга. Затем образцы окрашивают с использованием флуоресцентно меченных антител. Показаны схематично все мыши, обработанные различными CART клетками (фиг. 20). Обработка CLL-1-CART клетками не приводит к существенному снижению популяции CD123 bright. Затем образцы окрашивают с использованием флуоресцентно меченных антител. Показаны
 25 характерные отображения костного мозга мышей, обработанных различными CART клетками (фиг. 21).

Пример 4. Оценка CLL-1-CART клеток in vivo

PL-21 представляет собой клеточную линию острого миелоидного лейкоза человека, выделенную из периферической крови 24-летнего пациента мужчины с рефрактерным
 30 острым промиелоцитарным лейкозом, и которую можно вырастить как ксенотрансплантат в мыши с ослабленным иммунитетом. Ксенотрансплантат имитирует заболевание в костном мозгу как у людей, создавая модель, с которой проверяют эффективность терапий в отношении AML в кости. Таких мышей можно использовать в испытании эффективности химерного антигенного рецептора (CAR) Т-клеток,
 35 специфических для клеточных маркеров, обнаруженных на клетках острого миелоидного (или промиелоцитарного) лейкоза, таких как CLL-1 (молекула типа лектина С-типа). Клетки PL-21 метят репортерным геном люциферазы светлячков и используют в ортотипической модели острого миелоидного лейкоза (AML) у мышей NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) для испытания эффективности CAR Т-клеток,
 40 специфических для CLL-1.

Экспрессию CLL-1 проверяют на клетках PL-21, и такие клетки используют в анализах in vitro для того, чтобы проверить способность CLL-1-специфических CAR Т-клеток узнавать и реагировать на мишень. Клетки PL-21 растут in vivo, когда имплантированы
 45 внутривенно через хвостовую вену, и рост ограничивается главным образом костным мозгом. Через одну неделю после того, как опухолевые клетки имплантированы, заболевание полностью смещается в кости и начинает усиливаться экспоненциально. Ооставшиеся необработанными мыши начнут отображать клинические симптомы и паралич задних конечностей через 4-6 недель после имплантации опухоли. Исследование,

описанное в этом примере, изучает, показывает ли какой-нибудь из CLL-1-специфических клонов scFv из скрининга *in vitro* активность против опухолей на такой модели с ксенотрансплантатом *in vivo*.

Указанные далее материалы и способы используют в экспериментах, описанных в настоящем описании.

Материалы и способы

Клеточная линия PL-21. Клеточную линию PL-21 AML человека выделяют из периферической крови пациента с острым миелоидным лейкозом. Затем клетки метят люциферазой светляков. Такие клеточные суспензии растут в RPMI с добавлением 10% инактивированной нагреванием сыворотки плода коровы.

Мыши. Мышей NSG (NOD.Cg-*Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ*) в возрасте 6 недель получают у Jackson Laboratory (номер линии 005557). Животным дают акклиматизироваться в благоприятных для животных условиях по Novartis NIBRI в течение по меньшей мере 3 дней пред опытами. Животных содержат согласно правилам и указаниям Novartis.

Имплантация опухоли. Клетки PL-21-luc выращивают и размножают *in vitro* в RPMI с добавлением 10% инактивированной нагреванием сыворотки плода коровы. Затем клетки переносят в 50-мл коническую пробирку и дважды промывают холодным стерильным PBS. Затем клетки PL-21-luc считают и ресуспендируют в концентрации 10×10^6 клеток на миллилитр PBS. Клетки помещают на лед и сразу же (в пределах одного часа) имплантируют мышам. Клетки PL-21-luc инъецируют внутривенно в хвостовую вену в объеме 100 мкл в целом 1×10^6 клеток на мышь.

Дозирование CAR T-клеток. Мышам вводят 5×10^6 CAR⁺ T-клеток через 8 дней после имплантации опухоли. Клетки частично оттаивают на водяной бане при 37 градусах по Цельсию и затем полностью оттаивают, добавляя 1 мл холодного стерильного PBS в пробирку, содержащую клетки. Оттаявшие клетки переносят в 15-мл пробирку фалькон и доводят до конечного объема 10 мл PBS. Клетки дважды промывают при 1000 об/мин в течение 10 минут каждый раз и затем считают на гемоцитометре. CAR T клетки нормализуют для трансдукции CAR так, что каждая группа имеет один и тот же процент CAR⁺ T-клеток. Затем 5×10^6 CAR⁺ T-клеток ресуспендируют в концентрации 50×10^6 CAR⁺ T-клеток на мл холодного PBS и держат на льду до тех пор, пока не дадут мышам. Мышам инъецируют внутривенно в хвостовую вену 100 мкл CAR T клеток для дозы 5×10^6 CAR⁺ T-клеток на мышь

Восемь мышей на группу обрабатывают 100 мкл одного PBS (PBS), CD19 контрольных CAR T-клеток (CD19), CLL-1-6 (клон 6) CAR T-клеток, CLL-1-9 (клон 9) CAR T-клеток, CLL-1-10 (клон 10) CAR T-клеток, CLL-1-11 (клон 11) CAR T-клеток и CLL-1-12 (клон 12) CAR T-клеток. Все T-клетки получают от одного и того же донора человека параллельно.

Контроль за животными. Состояние здоровья мышей контролируют ежедневно, включая измерения массы тела дважды в неделю. Процент изменения массы тела вычисляют как $(BW_{\text{текущая}} - BW_{\text{начальная}}) / (BW_{\text{начальная}}) \times 100\%$. Опухолевую нагрузку контролируют дважды в неделю с помощью биолуминисцентной визуализации. Мышам интраперитонеально инъецируют D-люциферин за 10 минут до введения и визуализации мышей с помощью ксеногена. Бремя заболевания вычисляют, вычисляя биолуминесценцию опухолевых клеток (фотоны/секунда).

Величины обработка/контроль (Т/С), в процентах, вычисляют с использованием следующих формул:

$\% T/C = 100 \times \Delta T / \Delta C$, если $\Delta T \geq 0$;

$\% \text{ регрессии} = 100 \times \Delta T / T_{\text{начальная}}$, если $\Delta T < 0$;

где T = средняя люминисценция в группе, обработанной лекарственным средством, в последний день исследования; $T_{\text{начальная}}$ = средняя люминисценция в группе, обработанной лекарственным средством в первый день дозирования; ΔT = средняя люминисценция в группе, обработанной лекарственным средством в последний день исследования - средняя люминисценция в группе, обработанной лекарственным средством в первый день; C = средняя люминисценция в контрольной группе в последний день исследования и ΔC = средняя люминисценция в контрольной группе в последний день исследования - средняя люминисценция в контрольной группе в первый день дозирования.

Величины T/C в интервале 100% - 42% интерпретируются как отсутствие или минимальная противоопухолевая активность; величины $T/C \leq 42\%$ и $> 10\%$ интерпретируются как наличие противоопухолевой активности или ингибирования роста опухоли. Величины $T/C \leq 10\%$ или величины регрессии $\geq -10\%$ интерпретируются как наличие стаза опухоли. Величины регрессии $< -10\%$ сообщаются как регрессия.

FACS анализ периферической крови. Также контролируют Т-клетки в периферической крови мышей. У мышей берут кровь еженедельно из хвостовой вены в сенсibilизированные ЭДТК пробирки, которые держат на льду. Из пробирок 10 мкл крови помещают в 96-луночные планшеты на льду. Красные клетки крови лизируют с буфером для лизиса АСК (Life Technologies, каталожный номер A10492-01) и затем дважды промывают холодным PBS. Клетки инкубируют с Fc блокирующей смесью Fc-блока человека и мыши (Miltenyi Biotec, каталожные номера 130-059-901 и 130-092-575) в течение 30 минут и затем инкубируют с антимышиным CD11b, античеловеческим CD45, античеловеческим CD4, античеловеческим CD8 и CLL-1-Fc или антителами к белку L, и затем еще раз. Клетки фиксируют 2% раствором параформальдегида в течение 20 минут, промывают и хранят в PBS+2% FBS в течение ночи перед анализом на BD Fortessa, с последующим дополнительным анализом с использованием программы анализа FlowJo FACS. Клетки анализируют для определения числа клеток $CAR^+ CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток на миллилитр крови у мышей NSG с опухолью PL-21-luc. Число Т-клеток в крови сообщают как среднее+среднеквадратическая ошибка (SEM).

Результаты

Противоопухолевую активность панели CLL-1-специфических CAR Т-клеток (клон 6, 9, 10, 11 и 12) оценивают и непосредственно сравнивают с PL-21 моделью AML человека. После имплантации опухоли в день 0 мышей произвольно распределяют по группам обработки и обрабатывают 5×10^6 CAR+ Т-клеток внутривенно в день 8. Бремя заболевания AML и здоровье животного контролируют до тех пор, пока животные не достигнут конечной точки. Мышей в контрольных PBS и C19 группах вместе с группами CLL-1-11 и CLL-1-12 умерщвляют в день 18 после дозирования CAR Т клеток (26 дней после имплантации опухоли), когда бремя заболевания в контрольных группах было вблизи максимальной люминисценции при визуализации. Мышей в остальных группах, обработанных CLL-1-CAR Т-клетками (CLL-1-6, CLL-1-9 и CLL-1-10), умерщвляют в день 25 после дозирования CAR Т клеток (33 дня после имплантации опухоли) для возможности сравнения конечных образцов всех групп.

Задержку в развитии заболевания наблюдают между контрольными группами и обработанными CLL-1-6, CLL-1-9 и CLL-1-10 группами, и замедление роста опухоли в поздние моменты времени в группах, обработанных CLL-1-11 и CLL-1-12 CAR Т-

клетками. По вычислениям в последний момент времени со всеми представленными группами (день 18 после дозы CAR T-клеток), все группы с CLL-1-CAR T-клетками существенно отличаются от контрольных групп. По сравнению с мышами, обработанными PBS, группа, обработанная CD19 CAR T-клетками, не показывает

5 значимости с величиной $P=0,496$. Все группы, обработанные CLL-1-CAR T-клетками, по сравнению с PBS имеют $P \leq 0,01$ (клон 6 $P=0,0008$; клон 9 $P=0,0006$; клон 10 $P=0,0006$; клон 11 $P=0,0013$; клон 12 $P=0,0109$). Три клона CLL-1, которые показывают начальную задержку в развитии опухоли, клоны 6, 9 и 10, показывают стаз в росте опухоли в день 18 после дозы CAR T-клеток. Другие два клона, клоны 11 и 12, показывают

10 противоопухолевую активность в этот момент времени, хотя в более ранние моменты они не показывали никакой задержку в развитии опухоли. Вычисленные на день 18 после дозы T-клеток, величины процента дельта T/C для каждой обработанной группы по сравнению с контрольной группой PBS следующие: 98,38% для CD19, 3,15% для CLL-1-6, 2,04% для CLL-1-9, 4,92% для CLL-1-10, 13,42% для CLL-1-11 и 25,19% для CLL-

15 1-12. На основании этих величин, группа, обработанная CD19 CAR T-клетками, не показывает активности, группы, обработанные CLL-1-6, -9 и -10 CAR T-клетками, показывают стаз в росте опухоли, и группы, обработанные CLL-1-11 и -12 CAR T-клетками, показывают противоопухолевую активность.

Результаты биолюминесцентной визуализации в этом исследовании показаны на

20 фигуре 24. Группа, обработанная PBS, которая не получала какие-либо T-клетки, показывает базовую линию кинетики роста опухоли PL-21 у имплантированных внутривенно мышей NSG. Группа обработки C19 получила контрольные CD19 CAR T-клетки, неспецифичные для клеток PL-21, которые претерпевают такой же процесс экспансии *in vitro*, что и CAR T-клетки. Эти клетки служат в качестве контрольных T-

25 клеток для демонстрации неспецифической реакции на T-клетки у такой модели опухоли. Группы, обработанные как PBS, так и CD19 CAR T-клетками, показывают непрерывное развитие опухоли в ходе эксперимента.

Кроме контроля бремени заболевания по биолюминесценции, число CAR⁺ T-клеток в каждой группе также контролировалось анализом FACS периферической крови.

30 Результаты FACS в этом исследовании показаны на фигурах 25A и 25B. Группы, которые показывают самую большую противоопухолевую активность и задержку роста опухоли после обработки CAR T-клетками, показывают возрастание как CD4⁺CAR⁺ (фигура 25A), так и CD8⁺CAR⁺ T-клеток (фигура 25B) в периферической крови в поздние моменты

35 времени. Ограниченное число клеток наблюдают в периферической крови в ранние моменты времени. AML имеет место преимущественно в костном мозгу, и CAR T-клетки также могут находиться в костном мозгу в такие моменты времени. В конечный момент времени не имеется размножающейся популяции CAR T-клеток в периферической крови для групп CLL-1-6, CLL-1-9 и CLL-1-10.

40 В конце исследования у мышей собирают селезенки и клетки костного мозга и анализируют для определения, сохраняются ли CAR T-клетки. Как видно на фигурах 26A-26D, CD4 и CD38 CAR⁺ T-клетки отмечаются в заметном числе в обработанных группах CLL-1-9 и CLL-1-10. Экспансия T-клеток также видна в некоторых других группах, в частности, в группе, обработанной CLL-1-12 CAR T-клетками. Однако, хотя

45 большое число CD4⁺, так и CD8⁺ T-клеток видно в костном мозгу этой группы, клетки не являются CAR⁺, что указывает на неспецифическую экспансию T-клеток у таких мышей. CLL-1-6, CLL-1-9 и CLL-1-10 показывают самое большое противоопухолевое действие и задержку в росте опухоли, и это соответствует конечному числу CAR⁺ T-

клеток в костном мозгу. Как замечание, CLL-1-6 CAR не детектировали, так что число CAR+ в этой группе может быть недооценено. Незначительная персистенция как CD4, так и CD8 Т-клеток в группе CLL-1-11 и наибольшее число этих клеток в группе CLL-1-12 может коррелировать с неспецифической поздней стадией активности на опухолях, приводящей к незначительному падению опухолевой нагрузки, видной в последние моменты времени на фигуре 24.

В конце исследования также определяют фенотип клеток в селезенке. Подобно тому, что наблюдают в образцах костного мозга этих мышей, группами с заметным числом CD4 и CD8 CAR⁺ Т-клеток в селезенке являются только CLL-1-9 и CLL-1-10 группы, как видно на фигурах 27A-27D. Они также являются единственными группами, которые имеют большое число CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в селезенке. Группы CLL-1-11 и CLL-1-12 не показывают накопление не-CAR Т-клеток в селезенке, которое наблюдают в образцах костного мозга. Из-за большого изменения CAR+ Т-клеток, детектируемых в образцах селезенки мышей CLL-1-10, эта группа не коррелирует, так как существенно отличается при сравнении с контрольными группами.

Обсуждение

Противоопухолевую активность новых CLL-1-CAR трансдуцированных Т-клеток оценивают в исследовании эффективности на модели AML человека на мышах NSG с ксенотрансплантатом. Такие исследования показывают, что модель PL-21-luc повторяет AML человека у мышей NSG и способна являться мишенью для CLL-1-CAR Т-клеток (фигура 24). Исследование показывает, что три варианта CLL-1-CAR (CLL-1-6, CLL-1-9 и CLL-1-10) способны усиливать противоопухолевую реакцию на модели с ксенотрансплантатом AML (фигура 24). Минимальное число CAR Т-клеток обнаружено в крови всех четырех групп, однако в последние моменты времени CAR Т-клетки в группах CLL-1-6, CLL-1-9 и CLL-1-10 видны в возрастающем числе (фигуры 25A и 25B). Группы, обработанные такими тремя типами CAR Т-клеток, и в частности, CLL-1-9 и CLL-1-10, показывают значительное число CAR Т-клеток в последних образцах костного мозга и селезенки в конце исследования (фигуры 26A-26D и 27A-27D). Группа CLL-1-6 также показывает начальную и продолжающуюся задержку роста опухоли, но конечное число CAR Т-клеток нельзя точно вычислить из-за различий в детекции экспрессии scFv на поверхности Т-клеток. Взятые вместе группы CLL-1-9 и CLL-1-10 показывают задержку роста опухоли, возрастание числа CD4⁺ CAR Т-клеток и CD8⁺ CAR Т-клеток в периферической крови наряду со значительным числом CD4⁺ CAR Т-клеток и CD8⁺ CAR Т-клеток в последних образцах костного мозга и селезенки. Только группа CLL-1-9 имеет существенно различные количества CD4⁺ CAR Т-клеток и CD8⁺ CAR Т-клеток как в костном мозгу, так и в селезенке по сравнению с контрольными группами.

Пример 5. Химиотерапия и комбинированная терапия с CLL-1-CAR

Действие CLL-1-CAR терапии в сочетании с химиотерапией проверяют с использованием мышинной модели AML *in vivo*. Обработка сначала химиотерапией, а затем CLL-1-CART клетками (клон 6) приводит к уничтожению первичных ксенотрансплантатов AML.

Мышам NSG, которые дополнительно являются трансгенными для фактора стволовых клеток, GM-CSF и IL-3 (NSG-S), инъецируют первичные бласты AML (3×10^6 инъекцией в хвостовую вену, день 0). Через 4-6 недель берут периферическую кровь (PB) для подтверждения приживления, которое определяют как присутствие в кровотоке >1% лейкозных клеток (живые человеческие клетки CD45dim). Затем

ксенотрансплантаты AML обрабатывают цитарабином (Ara-C, 60 мг/кг интраперитонеальной инъекцией, ежедневно между днями 35-39). Отсчеты для периферической крови контролируют, и затем эти ксенотрансплантаты рандомизируют для получения направленных на CLL1 CART клеток или контрольных

нетрансдуцированных Т-клеток (1×10^5 I.V.) в день 55. После этого выполняют ряд заборов ретробитальной крови, и вычисляют абсолютное число лейкозных бластов как меру бремени заболевания, и ксенотрансплантаты оставляют до выживания.

Фигура 33В включает характерные графики средней интенсивности флуоресценции (MFI) CLL1 в лейкозных клетках (компармент живых huCD45dim), и показывает, что обработка химиотерапией приводит к положительной регуляции антигена CLL-1 в оставшемся AML. Имеется существенное возрастание в CLL1-MFI в ксенотрансплантатах AML через две недели после обработки химиотерапией цитарабином.

Мыши, которых обрабатывали индукционной химиотерапией, а затем нетрансдуцированными Т-клетками, не показывают снижения числа лейкозных бластов в периферической крови. Напротив, мыши, обработанные индукционной химиотерапией, а затем CLL-1-CART, имеют в результате существенное снижение числа лейкозных бластов в периферической крови и исчезновение лейкоза в ксенотрансплантатах AML, как показано на фигуре 33С. Графики представляют абсолютное число лейкозных бластов на 1 мкл периферической крови (среднее $\pm$ SD) в различные моменты времени после инъекции AML, как показано. Анализ общей выживаемости также показывает, что индукционная химиотерапия с последующей терапией CLL-1-CART, но не нетрансдуцированными Т-клетками, приводит к существенному преимуществу в общей выживаемости у ксенотрансплантатов AML (фигура 33В).

Пример 6. Малая доза RAD001 стимулирует пролиферацию CART в модели клеточной культуры

Действие малой дозы RAD001 на пролиферацию CAR Т-клеток *in vitro* оценивают путем сокультивирования CART-экспрессирующих клеток с клетками-мишенями в присутствии различной концентрации RAD001.

Материалы и способы

Получение CAR-трансдуцированных Т-клеток

Гуманизированный античеловеческий CD19 CAR (huCART19) лентивирусный трансферный вектор используют для получения геномного материала, упакованного в VSVg псевдотипированные лентивирусные частицы. Аминокислотная и нуклеотидная последовательность гуманизированного античеловеческого CD19 CAR (huCART19) представляют собой CAR 1, ID 104875, описанный в публикации PCT WO2014/153270, поданной 15 марта, 2014, и обозначены в ней SEQ ID NO. 85 и 31.

ДНК лентивирусного трансферного вектора смешивают с тремя пакующими компонентами VSVg env, gag/pol и rev в комбинации с реагентом липофектаминам для трансфекции клеток Lenti-X 293T. Среду затем заменяют через 24 часа и 30 час, вирусодержащие среды собирают, фильтруют и хранят при -80°C . CART получают путем трансдукции свежих или замороженных наивных Т-клеток, полученных отрицательной магнитной селекцией крови здорового донора или лейкопака. Т-Клетки активируют инкубацией с анти-CD3/анти-CD28 гранулами в течение 24 час, после чего вирусный супернатант или концентрированный вирус (MOI=2 или 10, соответственно) добавляют к культурам. Модифицированным Т-клеткам дают размножаться в течение примерно 10 дней. Процент трансдуцированных клеток (экспрессирующих CAR на клеточной поверхности) и уровень экспрессии CAR (относительная интенсивность флуоресценции, Geo Man) определяют анализом методом проточной цитометрии между

днями 7 и 9. Комбинация ослабления скорости роста и объема Т-клеток, приближающегося к ~350 фл, определяет состояние Т-клеток для криоконсервации для дальнейших анализов.

Оценка пролиферации CART

5 Для того, чтобы оценить функциональность CART, Т-клетки оттаивают и считают, и оценивают жизнеспособность Cellometer. Число CAR-положительных клеток в каждой культуре нормализуют с использованием нетрансдуцированных Т-клеток (UTD). Влияние RAD001 на CART проверяют титрованием с RAD001, начиная с 50 нМ. Линией клеточ-
10 мишеней, используемой во всех экспериментах с сокультивированием, является Nalm-6, клеточная линия пре-В-клеточного острого лимфобластного лейкоза человека (ALL), экспрессирующая CD19 и трансдуцированная для экспрессии люциферазы.

Для измерения пролиферации CART Т-клетки культивируют с клетками-мишенями в соотношении 1:1. Анализ проводят в течение 4 дней, когда клетки окрашивают для экспрессии CD3, CD4, CD8 и CAR. Число Т-клеток оценивают проточной цитометрией
15 с использованием гранул для подсчета в качестве эталона.

Результаты

Пролиферативную способность клеток CART оценивают анализом в день 4 сокультивирования. Число CAR положительных CD3-положительных Т-клеток (темные столбики) и общее число CD3-положительных Т-клеток (светлые столбики) оценивают
20 после культивирования CAR-трансдуцированных и нетрансдуцированных Т-клеток с Nalm-6 (фиг. 31). Клетки huCART19 размножаются при культивировании в присутствии менее 0,016 нМ RAD001 и в меньшей степени при более высоких концентрациях соединения. Важно, что как при 0,0032 нМ, так и при 0,0016 нМ RAD001 пролиферация более высокая, чем наблюдаемая без добавления RAD001. Нетрансдуцированные Т-
25 клетки (UTD) не показывают детектируемой экспансии.

Пример 7. Малая доза RAD001 стимулирует экспансию CART in vivo

В этом примере оценивается способность клеток huCART19 к пролиферации in vivo с различными концентрациями RAD001.

Материалы и способы

30 *Клетки NALM6-luc*. Клеточную линию острого лимфобластного лейкоза (ALL) человека NALM6 получают из периферической крови пациента с рецидивным ALL. Затем клетки метят люциферазой светляков. Такие суспендированные клетки растут в RPMI с добавлением 10% инактивированной нагреванием сыворотки плода коровы.

35 *Мыши*. Мышей NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) в возрасте 6 недель получают в Jackson Laboratory (номер линии 005557).

Имплантация опухоли. Клетки NALM6-luc выращивают и размножают in vitro в RPMI с добавлением 10% инактивированной нагреванием сыворотки плода коровы. Затем клетки переносят в 15-мл коническую пробирку и дважды промывают холодным
40 стерильным PBS. Затем клетки NALM6-luc считают и ресуспендируют в концентрации 10×10^6 клеток на миллилитр PBS. Клетки помещают на лед и сразу же (в пределах одного часа) имплантируют мышам. Клетки NALM6-luc инъецируют внутривенно в хвостовую вену в объеме 100 мкл в целом 1×10^6 клеток на мышь.

45 *Дозирование CAR Т-клеток*. Мышам вводят 5×10^6 CAR Т-клеток через 7 дней после имплантации опухоли. Клетки частично оттаивают на водяной бане при 37 градусах по Цельсию и затем полностью оттаивают, добавляя 1 мл холодного стерильного PBS в пробирку, содержащую клетки. Оттаявшие клетки переносят в 15-мл пробирку фалькон, и доводят до конечного объема 10 мл PBS. Клетки дважды промывают при

1000 об/мин в течение 10 минут каждый раз и затем считают на гемоцитометре. Затем Т-клетки ресуспендируют в концентрации 50×10^6 CAR Т-клеток на миллилитр холодного PBS и держат на льду до тех пор, пока не дают мышам. Мышам инъецируют

5 внутривенно в хвостовую вену 100 мкл CAR Т-клеток для дозы 5×10^6 CAR Т-клеток на мышь.

Дозирование RAD001. Получают концентрированную микроэмульсию 50 мг, равнозначных 1 мг RAD001, и затем ресуспендируют в DSM (5% декстрозы в воде) на время дозирования. Мышам ежедневно перорально (через оральный зонд) в 200 мкл

10 дают нужные дозы RAD001.

Анализ РК. Мышам ежедневно дают RAD001, начиная с 7 дня после имплантации опухоли. Группы получают следующие дозы: 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг и 10 мг/кг. У мышей берут кровь в дни 0 и 14 после первой и последней дозы RAD001, в следующие моменты времени для анализа РК: 15 минут, 30 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 8 часов, 12

15 часов и 24 часа.

Результаты

Экспансию и фармакокинетику RAD001 проверяют на мышах NSG с опухолями NALM6-luc. Ежедневное пероральное дозирование одного RAD001 не оказывает влияния на рост опухолей NALM6-luc (фигура 32). Анализ фармакокинетики RAD001 показывает, что она довольно устойчива в крови мышей с опухолями (фигура 33А и 33В). Анализы

20 РК как в день 0, так и в день 14 показывают, что концентрации RAD001 в крови превышают 10 нМ даже через 24 часа после дозирования в самой малой испытываемой дозе (0,3 мг/кг).

Основываясь на таких дозах, клетки huCAR19CART дозируют с RAD001 и без него для того, чтобы определить способность этих клеток к пролиферации. Самая высокая

25 используемая доза составляет 3 мг/кг, на основании уровней RAD001 в крови через 24 часа после дозирования. Так как концентрация RAD001 составляет выше 10 нМ через 24 часа после конечной дозы RAD001, для исследования с CAR Т-клетками *in vivo* используют несколько меньшие дозы RAD001. Клетки CART дают IV за день до начала

30 ежедневного перорального дозирования RAD001. Мышей контролируют FACS на экспансию Т-клеток.

Наименьшие дозы RAD001 показывают усиленную пролиферацию CAR Т-клеток. Такая усиленная пролиферация более очевидна и продолжительна с CD4+ CAR Т-клетками, чем с CD8+ CAR Т-клетками. Однако с CD8+ CAR Т-клетками усиленная

35 пролиферация может быть обнаружена в более ранние моменты времени после дозы CAR Т-клеток.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

Раскрытия каждого и каждый патент, заявка на патент и публикация, цитированные в настоящем описании, полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

40 Хотя настоящее изобретение раскрыто с обращением к конкретным аспектам, очевидно, что другие аспекты и варианты настоящего изобретения могут быть разработаны специалистами в данной области техники без отхода от сущности и объема изобретения. Предполагается, что прилагаемая формула изобретения составлена так, что включает все такие аспекты и эквивалентные варианты.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

45 <110> NOVARTIS AG

THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA

<120> ЛЕЧЕНИЕ РАКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХИМЕРНОГО АНТИГЕННОГО РЕЦЕПТОРА CLL-1

<130> N2067-7044WO3
 <140> PCT/US2015/041337
 <141> 2015-07-21
 <150> PCT/CN2014/090500
 5 <151> 2014-11-06
 <150> PCT/CN2014/082602
 <151> 2014-07-21
 <160> 495
 <170> Версия PatentIn 3.5
 10 <210> 1
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 15 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический пептид"
 <400> 1
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu
 20 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro
 20
 <210> 2
 <211> 45
 25 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический
 30 полипептид
 <400> 2
 Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
 1 5 10 15
 Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
 35 20 25 30
 Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
 35 40 45
 <210> 3
 <211> 230
 40 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический
 45 полипептид
 <400> 3
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
 1 5 10 15

RU 2 741 120 C2

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 20 25 30
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 35 40 45
 5 Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 50 55 60
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 65 70 75 80
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 10 85 90 95
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
 100 105 110
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 115 120 125
 15 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 130 135 140
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 145 150 155 160
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 20 165 170 175
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 180 185 190
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 195 200 205
 25 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220
 Leu Ser Leu Gly Lys Met
 225 230
 <210> 4
 30 <211> 282
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 35 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический
 полипептид"
 <400> 4
 Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala
 1 5 10 15
 40 Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala
 20 25 30
 Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys
 35 40 45
 Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro
 45 50 55 60
 Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Tyr Leu Leu Thr Pro Ala Val Gln
 65 70 75 80
 Asp Leu Trp Leu Arg Asp Lys Ala Thr Phe Thr Cys Phe Val Val Gly

RU 2 741 120 C2

		85		90		95	
		Ser Asp Leu Lys Asp Ala His Leu Thr Trp Glu Val Ala Gly Lys Val					
		100		105		110	
5		Pro Thr Gly Gly Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Arg His Ser Asn Gly					
		115		120		125	
		Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser Leu Trp Asn					
		130		135		140	
		Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser Leu Pro Pro					
		145		150		155	160
10		Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala Pro Val Lys					
		165		170		175	
		Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu Ala Ala Ser					
		180		185		190	
15		Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn Ile Leu Leu					
		195		200		205	
		Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe Ala Pro					
		210		215		220	
		Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala Trp Ser					
		225		230		235	240
20		Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr Tyr Thr					
		245		250		255	
		Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala Ser Arg					
		260		265		270	
		Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His					
25		275		280			
		<210> 5					
		<211> 10					
		<212> PRT					
		<213> Искусственная последовательность					
30		<220>					
		<221> источник					
		<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический пептид"					
		<400> 5					
35		Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser					
		1	5	10			
		<210> 6					
		<211> 24					
		<212> PRT					
40		<213> Искусственная последовательность					
		<220>					
		<221> источник					
		<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический пептид"					
45		<400> 6					
		Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu					
		1	5	10		15	
		Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys					

20

<210> 7

<211> 42

<212> PRT

5 <213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид"

10 <400> 7

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met

1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe

20 25 30

15 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

35 40

<210> 8

<211> 48

<212> PRT

20 <213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид"

25 <400> 8

Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro

1 5 10 15

Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr

20 25 30

30 Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro

35 40 45

<210> 9

<211> 112

<212> PRT

35 <213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид"

40 <400> 9

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

1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

20 25 30

45 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys

35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys

50 55 60

RU 2 741 120 C2

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95
5 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110
<210> 10
<211> 112
<212> PRT
10 <213> Homo sapiens
<400> 10
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1 5 10 15
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
15 20 25 30
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60
20 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
25 100 105 110
<210> 11
<211> 1184
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
30 <220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический
полинуклеотид"
<400> 11
35 cgtgaggctc cgggtgcccgt cagtgggcag agcgcacatc gccacagtc cccgagaagt 60
tggggggagg ggtcggcaat tgaaccggtg cctagagaag gtggcgcggg gtaaactggg 120
aaagtgatgt cgtgtactgg ctccgccttt ttcccagggg tgggggagaa ccgtatataa 180
gtgcagtagt cgccgtgaac gttctttttc gcaacgggtt tgccgccaga acacaggtaa 240
gtgccgtgtg tggttccccg gggcctggcc tctttacggg ttatggccct tgcgtgcctt 300
40 gaattacttc cacctggctg cagtacgtga ttcttgatcc cgagcttcgg gttggaagtg 360
ggtgggagag ttcgaggcct tgcgcttaag gagccccttc gcctcgtgct tgagttgagg 420
cctggcctgg gcgctggggc cgccgcgtgc gaatctggtg gcaccttcgc gcctgtctcg 480
ctgctttcga taagtctcta gccatttaaa atttttgatg acctgctgcg acgctttttt 540
tctggcaaga tagtcttgta aatgcggggc aagatctgca cactggtatt tcggtttttg 600
45 gggccgcggg cggcgacggg gcccgtcgt cccagcgcac atgttcggcg aggcggggcc 660
tgcgagcgcg gccaccgaga atcggacggg ggtagtctca agctggccgg cctgctctgg 720
tgccctggcct cgcgccgccg tgtatcgccc cgccctgggc ggcaaggctg gcccggtcgg 780
caccagttgc gtgagcggaa agatggccgc ttcccggccc tgctgcaggg agctcaaaat 840

	ggaggacgcg gcgctcggga gagcgggcggt gtgagtcacc cacacaaagg aaaagggcct	900
	ttccgtcctc agccgtcgct tcatgtgact ccacggagta ccgggcgccc tccaggcacc	960
	tcgattagtt ctcgagcttt tggagtacgt cgtcttttagg ttgggggggag gggttttatg	1020
	cgatggagtt tccccacact gagtgggtgg agactgaagt taggccagct tggcacttga	1080
5	tgtaattctc cttggaattt gccctttttg agtttggatc ttggttcatt ctcaagcctc	1140
	agacagtggg tcaaagtttt tttcttccat ttcagggtgc gtga	1184
	<210> 12	
	<211> 63	
	<212> ДНК	
10	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид"	
15	<400> 12	
	atggccctgc ctgtgacagc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca tgccgctaga	60
	ccc	63
	<210> 13	
	<211> 135	
20	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид"	
25	<400> 13	
	accacgacgc cagcgcgcgc accaccaaca ccggcgccca ccatcgctc gcagcccctg	60
	tccctgcgcc cagagggctg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg	120
	gacttcgcct gtgat	135
30	<210> 14	
	<211> 690	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
35	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид"	
	<400> 14	
	gagagcaagt acggccctcc ctgccccctc tgccctgccc ccgagttcct gggcggaccc	60
40	agcgtgttcc tgttcccccc caagcccaag gacaccctga tgatcagccg gacccccgag	120
	gtgacctgtg tgggtggtgga cgtgtcccag gaggaccccg aggtccagtt caactggtac	180
	gtggacggcg tggaggtgca caacgccaa accaagcccc gggaggagca gttcaatagc	240
	acctaccggg tgggtgtccgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggaa	300
	tacaagtgta aggtgtccaa caagggcctg ccagcagca tcgagaaaac catcagcaag	360
45	gccaagggcc agcctcggga gccccagggtg tacaccctgc cccctagcca agaggagatg	420
	accaagaacc aggtgtccct gacctgcctg gtgaagggct tctaccccag cgacatcgcc	480
	gtggagtggg agagcaacgg ccagcccag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg	540
	gacagcgacg gcagcttctt cctgtacagc cggctgaccg tggacaagag ccggtggcag	600

gagggcaacg tcttttagctg ctccgtgatg cacgaggccc tgcacaacca ctacaccag 660
aagagcctga gcctgtccct gggcaagatg 690
<210> 15
<211> 847
5 <212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический
10 полинуклеотид"
<400> 15
aggtggcccg aaagtcccaa ggcccaggca tctagtgttc ctactgcaca gccccaggca 60
gaaggcagcc tagccaaagc tactactgca cctgccacta cgcgcaatac tggccgtggc 120
ggggaggaga agaaaaagga gaaagagaaa gaagaacagg aagagaggga gaccaagacc 180
15 cctgaatgtc catcccatac ccagccgctg ggcgtctatc tcttgactcc cgcagtacag 240
gacttggtggc ttagagataa ggccaccttt acatgtttcg tcgtgggctc tgacctgaag 300
gatgccatt tgacttgga ggttgccgga aaggtaccca cagggggggg tgaggaaggg 360
ttgctggagc gccattccaa tggctctcag agccagcact caagactcac cttccgaga 420
tccctgtgga acgccgggac ctctgtcaca tgtactctaa atcatcctag cctgccccca 480
20 cagcgtctga tggcccttag agagccagcc gccaggcac cagttaagct tagcctgaat 540
ctgctcgcca gtagtgatcc cccagaggcc gccagctggc tcttatgcga agtgtccggc 600
tttagcccg ccaacatctt gctcatgtgg ctggaggacc agcgagaagt gaacaccagc 660
ggcttcgctc cagcccggcc cccaccccag ccgggttcta ccacattctg ggctggagt 720
gtcttaagggt tcccagcacc acctagcccc cagccagcca catacacctg tggtgtgtcc 780
25 catgaagata gcaggaccct gctaaatgct tctaggagtc tggagggttc ctacgtgact 840
gaccatt 847
<210> 16
<211> 30
<212> ДНК
30 <213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический
олигонуклеотид"
35 <400> 16
ggtggcggag gttctggagg tggagggttc 30
<210> 17
<211> 72
<212> ДНК
40 <213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический
олигонуклеотид"
45 <400> 17
atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtggggtcc ttctcctgtc actgggtatc 60
accctttact gc 72
<210> 18

<211> 126
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 5 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический
 полинуклеотид
 <400> 18
 aaacgggggca gaaagaaact cctgtatatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa 60
 10 actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 120
 gaactg 126
 <210> 19
 <211> 123
 <212> ДНК
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический
 полинуклеотид"
 20 <400> 19
 aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgccgcccc 60
 gggccsaccc gcaagcatta ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc 120
 tcc 123
 <210> 20
 25 <211> 336
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 30 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический
 полинуклеотид"
 <400> 20
 agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtaca agcagggcca gaaccagctc 60
 tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc 120
 35 cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 180
 gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240
 cggaggggcca aggggcacga tggcctttac cagggctctca gtacagccac caaggacacc 300
 tacgacgccc ttcacatgca ggccttgccc cctcgc 336
 <210> 21
 40 <211> 336
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 21
 agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc 60
 45 tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc 120
 cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 180
 gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240
 cggaggggcca aggggcacga tggcctttac cagggctctca gtacagccac caaggacacc 300

tacgacgccc ttccacatgca ggccctgccc cctcgc

<210> 22

<211> 373

<212> PRT

5 <213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид"

10 <400> 22

Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr

1 5 10 15

Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe

20 25 30

15 Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr

35 40 45

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu

50 55 60

Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu

20 65 70 75 80

Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn

85 90 95

Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala

100 105 110

25 Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg

115 120 125

Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly

130 135 140

Gln Phe Gln Thr Leu Val Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr

30 145 150 155 160

Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala

165 170 175

Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe

180 185 190

35 Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val

195 200 205

Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys

210 215 220

Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr

40 225 230 235 240

Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu

245 250 255

Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro

260 265 270

45 Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly

275 280 285

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

290 295 300

Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr
 305 310 315 320
 Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly
 325 330 335
 5 Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln
 340 345 350
 Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln
 355 360 365
 Ala Leu Pro Pro Arg
 10 370
 <210> 23
 <211> 1182
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 15 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический
 полинуклеотид"
 <400> 23
 20 atggccctcc ctgtcactgc cctgcttctc cccctcgcac tcctgctcca cgccgctaga 60
 ccacccgat ggtttctgga ctctccggat cgcccggtga atccccaac cttctcaccg 120
 gcaactcttg ttgtgactga gggcgataat gcgaccttca cgtgctcgtt ctccaacacc 180
 tccgaatcat tcgtgctgaa ctggtaccgc atgagcccgat caaaccagac cgacaagctc 240
 gccgcgtttc cggaagatcg gtcgcaaccg ggacaggatt gtcggttccg cgtgactcaa 300
 25 ctgccgaatg gcagagactt ccacatgagc gtggtccgcg ctaggcgaaa cgactccggg 360
 acctacctgt gcggagccat ctgcgtggcg cctaaggccc aaatcaaaga gagcttgagg 420
 gccgaactga gactgaccga gcgcagagct gaggtgcaa ctgcacatcc atccccatcg 480
 cctcggcctg cggggcagtt tcagaccctg gtcacgacca ctccggcgcc gcgcccaccg 540
 actccggccc caactatcgc gagccagccc ctgtcgtgta ggccggaagc atgccgcctt 600
 30 gccgcgggag gtgctgtgca taccggggga ttggacttcg catgcgacat ctacatttgg 660
 gtcctctctg ccggaacttg tggcgtgctc cttctgtccc tggatcatcac cctgtactgc 720
 aagcgggggtc ggaaaaagct tctgtacatt ttcaagcagc cttcatgag gcccggtgcaa 780
 accaccagcagg agggagcagc ttgctcctgc cgggtccccc aagaggaaga agggaggtgc 840
 gagctgcgcg tgaagtctc ccggagcgcc gacgcccccg cctataagca gggccagaac 900
 35 cagctgtaca acgaactgaa cctgggacgc cgggaagagt acgatgtgct ggacaagcgc 960
 cgcggccggg accccgaaat gggcggaag cctagaagaa agaaccctca ggaaggcctg 1020
 tataacgagc tgcagaagga caagatggcc gaggcctact ccgaaattgg gatgaaggga 1080
 gagcggcgga ggggaaagg gcacgacggc ctgtaccaag gactgtccac cgccaccaag 1140
 gacacatacg atgccctgca catgcaggcc cttccccctc gc 1182
 40 <210> 24
 <211> 394
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 45 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический
 полипептид"
 <400> 24

RU 2 741 120 C2

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

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 385 390
 <210> 25
 <211> 5
 5 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический
 10 пептид
 <400> 25
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 26
 15 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 20 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический
 полипептид"
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(30)
 25 <223> /примечание="Эта последовательность может охватывать 1-6 'Gly Gly Gly Gly Ser'
 повторяющихся звеньев, где некоторые позиции могут отсутствовать"
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="См. определение, представленное для подробного описания
 30 замен и предпочтительных воплощений"
 <400> 26
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 35 20 25 30
 <210> 27
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 40 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 27
 45 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser
 20

<210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 5 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический пептид"
 <400> 28
 10 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 29
 <211> 4
 <212> PRT
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический пептид"
 20 <400> 29
 Gly Gly Gly Ser
 1
 <210> 30
 <211> 5000
 25 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид"
 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(5000)
 <223> /примечание="Эта последовательность может охватывать 50-5000 нуклеотидов,
 35 где некоторые позиции могут отсутствовать"
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="См. определение, представленное для подробного описания замен и предпочтительных воплощений"
 40 <400> 30
 аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа 60
 аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа 120
 аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа 180
 аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа 240
 45 аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа 300
 аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа 360
 аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа 420
 аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа 480

[illegible]

	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3420
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3480
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3540
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3600
5	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3660
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3720
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3780
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3840
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3900
10	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3960
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4020
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4080
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4140
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4200
15	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4260
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4320
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4380
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4440
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4500
20	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4560
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4620
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4680
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4740
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4800
25	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4860
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4920
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4980
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa	5000
	<210> 31	
30	<211> 100	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<221> источник	
35	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид"	
	<400> 31	
	tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	60
	tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	100
40	<210> 32	
	<211> 5000	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
45	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид"	
	<220>	

<221> misc_feature

<222> (1)..(5000)

<223> /примечание="Эта последовательность может охватывать 50-5000 нуклеотидов, где некоторые позиции могут отсутствовать"

5 <400> 32

	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	60
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	120
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	180
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	240
10	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	300
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	360
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	420
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	480
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	540
15	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	600
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	660
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	720
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	780
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	840
20	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	900
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	960
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1020
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1080
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1140
25	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1200
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1260
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1320
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1380
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1440
30	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1500
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1560
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1620
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1680
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1740
35	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1800
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1860
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1920
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1980
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2040
40	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2100
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2160
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2220
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2280
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2340
45	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2400
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2460
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2520
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2580

	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2640
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2700
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2760
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2820
5	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2880
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2940
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3000
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3060
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3120
10	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3180
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3240
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3300
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3360
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3420
15	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3480
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3540
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3600
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3660
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3720
20	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3780
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3840
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3900
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3960
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4020
25	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4080
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4140
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4200
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4260
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4320
30	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4380
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4440
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4500
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4560
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4620
35	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4680
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4740
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4800
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4860
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4920
40	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4980
	tttttttttt	tttttttttt				5000
	<210> 33					
	<211> 5000					
	<212> ДНК					
45	<213> Искусственная последовательность					
	<220>					
	<221> источник					
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический					

полинуклеотид"

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(5000)

5 <223> /примечание="Эта последовательность может охватывать 100-5000 нуклеотидов,
где некоторые позиции могут отсутствовать"

<400> 33

	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	60
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	120
10	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	180
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	240
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	300
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	360
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	420
15	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	480
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	540
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	600
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	660
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	720
20	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	780
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	840
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	900
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	960
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1020
25	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1080
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1140
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1200
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1260
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1320
30	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1380
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1440
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1500
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1560
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1620
35	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1680
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1740
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1800
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1860
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1920
40	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1980
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2040
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2100
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2160
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2220
45	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2280
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2340
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2400
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2460

	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2520
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2580
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2640
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2700
5	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2760
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2820
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2880
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2940
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3000
10	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3060
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3120
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3180
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3240
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3300
15	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3360
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3420
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3480
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3540
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3600
20	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3660
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3720
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3780
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3840
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3900
25	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3960
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4020
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4080
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4140
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4200
30	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4260
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4320
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4380
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4440
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4500
35	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4560
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4620
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4680
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4740
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4800
40	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4860
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4920
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4980
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa				5000
	<210>	34				
45	<211>	400				
	<212>	ДНК				
	<213>	Искусственная последовательность				
	<220>					

<221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид"
 <220>
 5 <221> misc_feature
 <222> (1)..(400)
 <223> /примечание="Эта последовательность может охватывать 100-400 нуклеотидов, где некоторые позиции могут отсутствовать"
 <220>
 10 <221> источник
 <223> /примечание="См. определение, представленное для подробного описания замен и предпочтительных воплощений"
 <400> 34
 аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа 60
 15 аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа 120
 аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа 180
 аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа 240
 аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа 300
 аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа 360
 20 аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа 400
 <210> 35
 <211> 2000
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 25 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид"
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2000)
 <223> /примечание="Эта последовательность может охватывать 50-2000 нуклеотидов, где некоторые позиции могут отсутствовать"
 <400> 35
 35 аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа 60
 аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа 120
 аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа 180
 аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа 240
 аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа 300
 40 аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа 360
 аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа 420
 аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа 480
 аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа 540
 аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа 600
 45 аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа 660
 аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа 720
 аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа 780
 аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа 840

	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	900
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	960
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1020
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1080
5	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1140
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1200
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1260
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1320
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1380
10	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1440
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1500
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1560
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1620
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1680
15	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1740
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1800
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1860
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1920
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1980
20	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa	2000
	<210> 36	
	<211> 230	
	<212> PRT	
	<213> Искусственная последовательность	
25	<220>	
	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид"	
	<400> 36	
30	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe	
	1 5 10 15	
	Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr	
	20 25 30	
	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val	
35	35 40 45	
	Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val	
	50 55 60	
	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser	
	65 70 75 80	
40	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu	
	85 90 95	
	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser	
	100 105 110	
	Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro	
45	115 120 125	
	Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln	
	130 135 140	
	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala	

RU 2 741 120 C2

[illegible]

замен и предпочтительных воплощений"

<400> 38

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

5 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

20 25 30

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

35 40

<210> 39

10 <211> 247

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

15 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид"

<400> 39

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

20 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

25 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

30 Ala Arg Asp Leu Glu Met Ala Thr Ile Met Gly Gly Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser

35 130 135 140

Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr

145 150 155 160

Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His

165 170 175

40 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro

180 185 190

Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala

195 200 205

Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr

45 210 215 220

Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Leu Asp Val Val Phe Gly Gly

225 230 235 240

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

245

<210> 40

<211> 245

<212> PRT

5 <213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид"

10 <400> 40

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr

20 25 30

15 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

20 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Val Phe Asp Ser Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr

100 105 110

25 Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

115 120 125

Gly Ser Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu

130 135 140

Pro Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln

30 145 150 155 160

Ser Leu Val Tyr Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln

165 170 175

Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg

180 185 190

35 Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Asp

195 200 205

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr

210 215 220

Tyr Cys Met Gln Gly Thr His Trp Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr

40 225 230 235 240

Arg Leu Glu Ile Lys

245

<210> 41

<211> 247

45 <212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид"

<400> 41

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

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

Cys Ala Thr Pro Gly Thr Tyr Tyr Asp Phe Leu Ser Gly Tyr Tyr Pro
100 105 110

Phe Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met
130 135 140

Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr
145					150					155					160

Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr
165 170 175

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser
180 185 190

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

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

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
225 230 235 240

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

245

<210> 42

<211> 239

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

 $\langle 220 \rangle$

<221> ИСТОЧНИК

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид"

<400> 42

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

RU 2 741 120 C2

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Asn Ile Asn Glu Asp Gly Ser Ala Lys Phe Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60
5 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Leu Arg Ser Gly Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
10 100 105 110
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125
Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu
130 135 140
15 Ser Pro Gly Gly Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
145 150 155 160
Ser Gly Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
165 170 175
Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp
20 180 185 190
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
195 200 205
Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly
210 215 220
25 Ser Ser Pro Pro Thr Phe Gly Leu Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
225 230 235
<210> 43
<211> 245
<212> PRT
30 <213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический
полипептид"
35 <400> 43
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Pro Val Arg Ser Gly
20 25 30
40 Ser His Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
50 55 60
Leu Glu Asn Arg Val Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Asn Asn His Phe
45 65 70 75 80
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Leu Tyr Phe
85 90 95
Cys Ala Arg Gly Thr Ala Thr Phe Asp Trp Asn Phe Pro Phe Asp Ser

RU 2 741 120 C2

		100		105		110										
	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
			115						120				125			
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln
5			130				135					140				
	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Ile	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr
	145					150					155					160
	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln
					165					170					175	
10	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu
				180					185					190		
	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp
			195					200				205				
	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr
15		210					215				220					
	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr
	225					230					235					240
	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys											
					245											
20	<210>	44														
	<211>	249														
	<212>	PRT														
	<213>	Искусственная последовательность														
	<220>															
25	<221>	источник														
	<223>	/примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид"														
	<400>	44														
	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Ala	Gly	Leu	Leu	Lys	Pro	Ser	Glu
30	1			5					10					15		
	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Val	Tyr	Gly	Gly	Ser	Phe	Ser	Gly	Tyr
			20						25				30			
	Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45				
35	Gly	Glu	Ile	Asn	His	Ser	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys
		50					55					60				
	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu
	65					70				75						80
	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
40					85				90					95		
	Arg	Gly	Ser	Gly	Leu	Val	Val	Tyr	Ala	Ile	Arg	Val	Gly	Ser	Gly	Trp
				100				105					110			
	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly
		115						120					125			
45	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln
		130					135					140				
	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val
	145					150					155					160

Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp
165 170 175
Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Met Tyr Ala Ala
180 185 190
5 Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
195 200 205
Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe
210 215 220
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Trp Thr Phe
10 225 230 235 240
Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
245
<210> 45
<211> 255
15 <212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
20 полипептид"
<400> 45
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
25 20 25 30
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
30 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Pro Ser Ser Ser Gly Ser Tyr Tyr Met Glu Asp Ser Tyr
35 100 105 110
Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120 125
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140
40 Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
145 150 155 160
Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn
165 170 175
Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Thr Val
45 180 185 190
Ile Tyr Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
195 200 205
Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly

210 215 220
 Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser
 225 230 235 240
 Ser Asn Gln Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 5 245 250 255
 <210> 46
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 10 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 полипептид"
 <400> 46
 15 Gln Val Asn Leu Arg Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 20 25 30
 Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 20 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 25 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Ala Leu Gly Ser Ser Trp Glu Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 30 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 130 135 140
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp
 145 150 155 160
 35 Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 165 170 175
 Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser
 180 185 190
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
 40 195 200 205
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp
 210 215 220
 Asn Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 225 230 235
 45 <210> 47
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полипептид"

5 <400> 47

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Pro Ala Asn Thr Phe Ser Asp His
20 25 30

10 Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Phe Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile His Ala Ala Asn Gly Gly Thr His Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Asn Thr Val Tyr
15 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Asn Ser Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

20 Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr
130 135 140

Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
25 145 150 155 160

Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln
165 170 175

Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser
180 185 190

30 Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Asn Gly Ser Gly Ser Gly Thr
195 200 205

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

Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly
35 225 230 235 240

Thr Lys Val Glu Ile Lys
245

<210> 48

<211> 248

40 <212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полипептид"

45 <400> 48

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

RU 2 741 120 C2

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
5 Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
10 85 90 95
Ala Arg Asp Leu Ser Val Arg Ala Ile Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125
15 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val
130 135 140
Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
145 150 155 160
Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp
20 165 170 175
Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala
180 185 190
Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
195 200 205
25 Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe
210 215 220
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly
225 230 235 240
Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
30 245
<210> 49
<211> 246
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
35 <220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
полипептид"
<400> 49
40 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Ser Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Ser Tyr
20 25 30
Gly Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
45 35 40 45
Ala Leu Ile Glu Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ser Lys Ser Thr Leu Tyr

RU 2 741 120 C2

	65		70		75		80									
	Leu	Gln	Met	Asp	Asn	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95		
	Ala	Arg	Glu	Gly	Asn	Glu	Asp	Leu	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly
5			100					105					110			
	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
			115					120					125			
	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Ile	Val	Leu	Thr
			130					135					140			
10	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile
	145					150					155				160	
	Thr	Cys	Gln	Ala	Ser	Gln	Phe	Ile	Lys	Lys	Asn	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln
				165						170					175	
	His	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Ala	Ser	Ser
15			180						185					190		
	Leu	Gln	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Asn	Arg	Ser	Gly	Thr
			195					200					205			
	Thr	Phe	Ser	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Val	Ala	Thr
			210					215					220			
20	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	His	Asp	Asn	Leu	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly
	225					230					235				240	
	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys										
				245												
	<210>	50														
25	<211>	255														
	<212>	PRT														
	<213>	Искусственная последовательность														
	<220>															
	<221>	источник														
30	<223>	/примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полипептид"														
	<400>	50														
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	1			5					10					15		
35	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Val	Ser	Ser	Asn
			20						25					30		
	Tyr	Met	Thr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35					40					45			
	Ser	Val	Ile	Tyr	Ser	Gly	Gly	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Gly	Asp	Ser	Val	Lys
40		50					55					60				
	Gly	Arg	Phe	Thr	Val	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu
	65					70				75				80		
	Gln	Met	Asn	Arg	Leu	Thr	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				85						90				95		
45	Arg	Asp	Arg	Leu	Tyr	Cys	Gly	Asn	Asn	Cys	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr
			100						105					110		
	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly
			115						120					125		

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140
Gly Gly Ser Asp Ile Gln Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
145 150 155 160
5 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
165 170 175
Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
180 185 190
Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg
10 195 200 205
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
210 215 220
Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser
225 230 235 240
15 Thr Pro Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
245 250 255
<210> 51
<211> 247
<212> PRT
20 <213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
полипептид"
25 <400> 51
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Ser Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Pro Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
30 Tyr Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asp Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
35 65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ser Asp Ser Tyr Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110
40 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met
130 135 140
Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
45 145 150 155 160
Phe Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala Trp Tyr
165 170 175
Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser

		180		185		190	
		Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly					
		195		200		205	
		Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala					
5		210		215		220	
		Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly					
		225		230		235	240
		Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys					
		245					
10	<210>	52					
	<211>	741					
	<212>	ДНК					
	<213>	Искусственная последовательность					
	<220>						
15	<221>	источник					
	<223>	/примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид"					
	<400>	52					
		gaagtgcaac tccaacagtc aggcgcagaa gtcaagaagc ccggatcgtc agtgaaagtg	60				
20		tcctgcaaag cctccggcgg aaccttcagc tcctacgcaa tcagctgggt gcggcaggcg	120				
		cccgacaggg gactggagtg gatgggcggg atcattccga tctttggcac cgccaattac	180				
		gcccagaagt tccagggacg cgtcacaatc accgccgacg aatcgacttc caccgcctac	240				
		atggagctgt cgtccttgag gagcgaagat accgccgtgt actactgcgc tcgggatctg	300				
		gagatggcca ctatcatggg gggttactgg ggccagggga ccctggtcac tgtgtcctcg	360				
25		ggaggagggg gatcaggcgg cggcggttcc gggggaggag gaagccagtc cgcgctgact	420				
		cagccagctt ccgtgtctgg ttcgccggga cagtccatca ctattagctg taccggcacc	480				
		agcagcgacg tgggcgggcta caactatgtg tcatggtacc agcagcacc ggggaaggcg	540				
		cctaagctga tgatctacga cgtgtccaac cgccctagcg gagtgtccaa cagattctcc	600				
		ggttcgaagt cagggaacac tgcctccctc acgattagcg ggctgcaagc cgaggatgaa	660				
30		gccgactact actgtcctc ctatacctcc tcctcgaccc tggacgtggg gttcggagga	720				
		ggcaccaagc tcaccgtcct t	741				
	<210>	53					
	<211>	735					
	<212>	ДНК					
35	<213>	Искусственная последовательность					
	<220>						
	<221>	источник					
	<223>	/примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид"					
40	<400>	53					
		gaagtgcaat tgggtgaaaag cggaggagga gtggtgcaac ctggaggaag cctgagactg	60				
		tcatgtgccg cctcgggatt cactttcgat gactacgcaa tgcaactgggt ccgccaggcc	120				
		cccgaaaagg gtctggaatg ggtgtccctc atctccggcg atgggggttc cacttactat	180				
		gcggattctg tgaagggccg cttcacaatc tcccgggaca attccaagaa cactctgtac	240				
45		cttcaaatga actccctgag ggtggaggac accgctgtgt actactgcgc gagagtgttt	300				
		gactcgtact atatggacgt ctggggaaaag ggcaccaccg tgaccgtgtc cagcgggtggc	360				
		ggtggatcgg ggggcggcgg ctccgggagc ggaggttccg agattgtgct gactcagtcg	420				
		ccgttgtcac tgcctgtcac ccccgggcag ccggcctcca tttcatgccg gtccagccag	480				

	tccctggtct acaccgatgg gaacacttac ctcaactggt tccagcagcg cccaggacag	540
	tccccgcgga ggctgatcta caaagtgtca aaccgggact ccggcggtccc cgatcggttc	600
	tcgggaagcg gcagcgacac cgacttcacg ctgaagattt cccgcgtgga agccgaggac	660
	gtgggcatct actactgtat gcagggcacc cactggtcgt ttaccttcgg acaaggaact	720
5	aggctcgaga tcaag	735
	<210> 54	
	<211> 741	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
10	<220>	
	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание Искусственная последовательность: синтетический полинуклеотид"	
	<400> 54	
15	caagtgcagc ttcaagaaaag cgggtccagga ctcgtcaagc catcagaaaac tctttccctc	60
	acttgtaccg tgtcgggagg cagcatctcc tcgagctcct actactgggg ttggattaga	120
	cagcccccg gaaaggggtt ggagtggatc ggttccatct actactccgg gtcgacctac	180
	tacaaccctt ccctgaaatc tcgggtgtcc atctccgtcg acacctcaa gaaccagttc	240
	agcctgaagc tgaaatatgt gaccgcggcc gatactgccg tgtactattg cgccaccccg	300
20	ggaacctact acgacttcct ctcggggtac taccggtttt actggggaca ggggactctc	360
	gtgaccgtgt cctcgggcgg cggaggttca ggcggtggcg gatcgggggg aggaggctca	420
	gacattgtga tgaccagag cccgtccagc ctgagcgcct ccgtgggcga tagggtcacg	480
	attacttgcc gggcggtcca gggaatctca agctacctgg cctggtacca acagaagccc	540
	ggaaaggcac ccaagttgct gatctatgcc gctagcactc tgcagtcagg ggtgccttcc	600
25	cgcttctccg gctccggctc gggcaccgac ttcaccctga ccatttcctc actgcaaccc	660
	gaggacttcg ccacttacta ctgccagcag ctgaactcct acccttacac attcggacag	720
	ggaaccaagc tggaatatcaa g	741
	<210> 55	
	<211> 717	
30	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид"	
35	<400> 55	
	caagtgcaac tcgtggaatc tgggtggagga ctcgtgcaac ccggaggatc attgcgactc	60
	tcgtgtgcgg catccggctt taccttttca tcctactgga tgtcctgggt cagacaggcc	120
	cccggaagg gactggaatg ggtcgcgaac atcaacgagg acggctcggc caagttctac	180
40	gtggactccg tgaagggccg cttcacgac tcacgggata acgccaagaa ttccctgtat	240
	ctgcaaatga acagcctgag ggccgaggac actgcggtgt acttctgcgc acgcgacctg	300
	aggtccggga gatactgggg acagggcacc ctcgtgaccg tgtcgagcgg aggagggggg	360
	tcgggcggcg gcggttccgg tggcggcggt agcgaattg tgttgaccca gtcccctgga	420
	accctgagcc tgtcacctgg aggacgcgcc accctgtcct gccgggccag ccagagcatc	480
45	tcagggtcct tcctggcttg gtaccagcag aagccgggac aggctccgag acttctgatc	540
	tacggcgcct cctcgcgggc gaccggaatc ccggtcgggt tctccggctc gggaagcgga	600
	actgacttca ctcttaccat ttccgcctg gagccggaag atttcgccgt gtactactgc	660
	cagcagtagc ggtcatcccc tccaaccttc ggcctgggaa ctaagctgga aatcaaa	717

<210> 56
 <211> 735
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 5 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 полинуклеотид"
 <400> 56
 10 gaagtgcaac tccaacaatc cgggtccagga ctcgtcagac cctccgaaac tctctcgctt 60
 acatgcaactg tgtccggcgcg ccctgtgcgg tccggctctc attactggaa ctggattcgc 120
 cagcccccg gacgcggact ggagtggatc ggctacatct attactcggg gtcgactaac 180
 tacaaccgga gcctggaaaa tagagtgacc atctcaatcg acacgtccaa caaccacttc 240
 tcgctgaagt tgtcctccgt gactgccgcc gatactgccc tgtacttctg tgctcgcgga 300
 15 accgccacct tcgactggaa cttccctttt gactcatggg gccaggggac cttgtgacc 360
 gtgtccagcg gaggaggagg ctccgggtgg ggcgggagcg gtagcggcg aagcgacatc 420
 cagatgaccc agtcaccgtc ctcgctgtcc gcatccattg gggatcgggt cactattact 480
 tgccgggcggt ccagtgccat ctcgtcctac ctgaactggg atcagcagaa gccagggaaa 540
 gcccccaagc tgctgatcta cgcggccagc agcctgcagt caggagtgcc ttcaagggtt 600
 20 agcggcagcg gatcggggaa cgacttcacc ctgaccattt cctccctcca acccgaggat 660
 ttgcgcaact actactgcca gcagtcctac tccaccccggt ggaccttcgg acagggaacc 720
 aagctggaga tcaag 735
 <210> 57
 <211> 747
 25 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 30 полинуклеотид"
 <400> 57
 caagtgcaac ttcaagaatc aggcgcagga cttctcaagc catccgaaac actctccctc 60
 acttgccgcg tgtacggggg aagcttctcg ggatactact ggtcctggat taggcagcct 120
 cccggcaaa ggcctggaatg ggtcgggggag atcaaccact ccggttcaac caactacaac 180
 35 ccgtcgctga agtcccgcgt gaccatttcc gtggacacct ctaagaatca gttcagcctg 240
 aagctctcgt ccgtgaccgc ggcggacacc gccgtctact actgcgctcg gggatcagga 300
 ctggtgggtg acgccatccg cgtgggctcg ggctggttcg attactgggg ccagggaacc 360
 ctggtcactg tgcgtcccg cggaggagggt tcggggggcg gagacagcg tggagggggt 420
 agcgacatcc agatgaccca gtccccgtcc tcgctgtccg cctccgtggg agatagagtg 480
 40 accatcacct gtcgggcatc ccagagcatt tccagctacc tgaactggta tcagcagaag 540
 cccggaaaag cccctaagct gttgatgtac gccgccagca gcttgagtc gggcggtgccg 600
 agccggtttt ccggttccgg ctccgggact gacttcaccc tgactatctc atccctgcaa 660
 cccgaggact tcgccactta ttactgccag cagtcctact caaccctcc ctggacgttc 720
 ggacagggca ccaaggtcga tatcaag 747
 45 <210> 58
 <211> 765
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид"

5 <400> 58

gaagtgcaat	tgggtggaatc	tggaggagga	cttgtgaaac	ctggtggaag	cctgagactt	60
tcctgtgцгг	cctcgggatt	cactttctcc	tcctactcca	tgaactgggt	cagacaggcc	120
cctgggaagg	gactggaatg	ggtgtcatcc	atctcctcct	catcgtcgta	catctactac	180
gccgatagcg	tgaaggggцг	gttcaccatt	tcccgggaca	acgctaagaa	cagcctctat	240
ctgcaaatga	attccctccg	cgccgaggac	actgccgtgt	actactgцгc	gagggacccc	300
tcatcaagcg	gcagctacta	catggaggac	tcgtattact	acggaatgga	cgctctggggc	360
cagggaaacca	ctgtgacggg	gtcctccggg	ggaggggggct	ccggggggcгг	gggatctggc	420
ggaggagggt	ccaacttcat	gctgaccцag	ccgcactccg	tgtccgaaag	ccccgaaag	480
accgtgacaa	tttcctgcac	cgggtcctcc	ggctcgatcg	catcaaacta	cgtgцagtgг	540
taccagcagc	gccccggгcг	cgccccccacc	actgtcatct	acgaggataa	ccagcgгccг	600
tcgggtgtcc	cagaccгgtt	ttccгgttcг	atcgatagca	gcagcaacag	cgctcctctg	660
accatttccг	gcctcaagac	cgaggatgag	gctgactact	actgccagtc	gtatgactcc	720
tcgaaccaag	tgggtgttcгг	tggcггcacc	aagctgactg	tgctg		765

<210> 59

20 <211> 717

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

25 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид"

<400> 59

caagtgaacc	tgagagaaaг	cgгcггagga	cttgtgcaac	ctggagggaг	cctgagactg	60
tcatgtgccг	cgтccггctt	caccttctcg	tcctacгaga	tgaactgggt	ccгccaggca	120
ccgggcaaaг	gactggaatg	ggtgtcctac	atttcctcgt	ccgggtccac	catctattac	180
gccgactccг	tgaagggгcг	gttcaccatc	tcccgggaca	acгccaagaa	ctccctctac	240
ctccaaatga	actcactgag	ggcagaggac	actgcгgtct	actactgцгc	ccгcгаagct	300
ttgggtagct	cctgggгagtг	gggccaggga	accactgtga	ccgtgtcctc	gggtggaggг	360
ggctccгgtг	гcгgggggttc	aggggggtggc	ggaagcgata	tccagatgac	tcagtcacca	420
agctccctga	гcгcctcagт	gggagatcгг	gtcacaaтca	cgтgccaggc	gtcccaggac	480
atttctaact	acctcaattг	gtaccagcгг	aagccгggga	aggcccccaa	gcttctgatc	540
tacgatgcct	ccaacctgga	aaccггcгgtг	ccctcccgct	tctcгggatc	ggгcггcггc	600
actgacttca	cctttaccat	ctcгtccctг	caacctgagg	acatcгccac	ctattactgc	660
cagcagtagc	ataacctccc	gctgactttc	ggaggcггgaa	ctaagctgga	gattaag	717

40 <210> 60

<211> 738

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

45 <221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид"

<400> 60

	caagtgcaac	tcgtccagtc	cggtgcagaa	gtcaaggaac	ccggagcctc	cgtgaaagtg	60
	tcctgcaaag	ctcctgccaa	cactttctcg	gaccacgtga	tgcactgggt	gcgccaggcg	120
	ccgggccagc	gcttcgaatg	gatgggatac	attcatgccg	ccaatggcgg	taccactac	180
	tccaaaaagt	tccaggatag	agtcaccatc	accggggaca	ccagcgccaa	caccgtgtat	240
5	atggatctgt	ccagcctgag	gtccgaggat	accgccgtgt	actactgcg	ccggggcgga	300
	tacaactcag	acgcgttcga	catttgggga	cagggtacta	tggtcaccgt	gtcatccggg	360
	ggcggtgga	gcgggggcgg	aggctctggc	ggaggcggat	cagggggagg	agggtccgac	420
	atcgtgatga	cccagtcccc	gtcatcggtg	tccgcgtccg	tgggagacag	agtgaccatc	480
	acgtgtcgcg	ccagccagga	catctcctcg	tggttggcat	ggtaccagca	gaagcctgga	540
10	aaggccccga	agctgctcat	ctacgccgcc	tcctcccttc	aatcgggagt	gccctcgcg	600
	ttcaacggaa	gcggaagcgg	gacagatttt	accctgacta	ttagctcgct	gcagcccag	660
	gacttcgcta	cttactactg	ccaacagagc	tactccaccc	cactgacttt	cggcggggggt	720
	accaaggtcg	agatcaag					738
	<210> 61						
15	<211> 744						
	<212> ДНК						
	<213> Искусственная последовательность						
	<220>						
	<221> источник						
20	<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид"						
	<400> 61						
	caagtgcaac	ttgttcaatc	cggtggagggt	cttgtgcagc	ccggaggatc	actcagactg	60
	tcgtgcgccg	cctctgggtt	cactttctcc	tcatactcga	tgaactgggt	gcgccaggcg	120
25	ccgggaaagg	gcctggaatg	ggtgtcatac	atctcctcct	catcctccac	catctactac	180
	gccgattccg	tgaagggccg	cttcaactatt	tcccgggaca	acgcgaaaaa	ctcgctctat	240
	ctgcaaata	actccctgcg	cgccgaggac	accgccgtgt	actactgcg	ccgggacctg	300
	agcgtgcggg	ctattgatgc	gttcgacatc	tggggacagg	gcaccatggg	cacagtgtcc	360
	agcggaggcg	gcggcagcgg	tggaggagga	tcagggggag	gaggttcggg	gggcgggtggc	420
30	tccgatatcg	tgctgaccga	gagcccgtcg	agcctctccg	cctccgtcgg	cgacagagt	480
	accatcacgt	gtcaggcatc	ccaggacatt	agcaactacc	tgaattggta	ccagcagaag	540
	cctggaaagg	cacccaagtt	gctgatctac	gacgcctcca	acctggaaac	cggagtgcc	600
	tccaggttct	cgggcagcgg	ctcgggaacc	gacttcactt	ttactatctc	ctccctgcaa	660
	cccgaggatt	tcgcgacct	ctactgccag	caggcctaca	gcaccccttt	caccttcggg	720
35	ccgggaacta	aggctcgaat	caag				744
	<210> 62						
	<211> 738						
	<212> ДНК						
	<213> Искусственная последовательность						
40	<220>						
	<221> источник						
	<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид"						
	<400> 62						
45	gaagtgcaat	tggtgcaatc	aggaggagga	gtggtcagat	ctggaagaag	cctgagactg	60
	tcatgcgcgg	cttcgggctt	taccttcaac	tcctacggcc	tccactgggt	gcgccaggcc	120
	cccgaaaaag	gcctcgaatg	ggtcgcactg	attgagtacg	acgggtccaa	caagtactac	180
	ggagatagcg	tgaagggccg	cttcaccatc	tcacgggaca	agtccaagtc	caccctgtat	240

	ctgcaaatgg acaacctgag ggccgaggat actgccgtgt actactgcg cgcgaagga	300
	aacgaagatc tggccttcga tatTTTggggc cagggTactc ttgtgaccgt gtcgagcgga	360
	ggcggaggct ccggtggagg aggatcgggg ggtggTggtt ccggcggcgg ggggagcgaa	420
	atcgtgctga ccagtcgcc ttccTccctc tccgcttccg tgggggaccg ggtcactatt	480
5	acgtgtcagg cgtcccaatt catcaagaag aatctgaact ggtaccagca caagccggga	540
	aaggccccca aactgctcat ctacgacgcc agctcgctgc agactggcgt gccttcccgg	600
	ttttccggga accggtcggg aaccaccttc tcattcacca tcagcagcct ccagccggag	660
	gacgtggcga cctactactg ccagcagcat gacaaccttc cactgacttt cggcgggggc	720
	accaaggtcg agattaag	738
10	<210> 63	
	<211> 765	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
15	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид"	
	<400> 63	
	caagtgcaac tcgtggaatc aggcggagga ctctgcaac ccggaggTtc ccttagactg	60
20	tcatgtgccg cttccgggtt caatgtgtcc agcaactaca tgacctgggt cagacaggcg	120
	ccgggaaagg gacttgaatg ggtgtccgtg atctactccg gtggagcaac atactacgga	180
	gactccgtga aaggccgctt taccgtgtcc cgcgataact cgaagaacac cgtgtacttg	240
	cagatgaaca ggctgactgc cgaggacacc gccgtgtatt attgcgcccg ggacaggctg	300
	tactgtggaa acaactgcta cctgtactac tactacggga tggacgtgtg gggacagggc	360
25	actctcgtca ctgtgtcatc cggggggggc ggtagcgggt gcggagggTc cggcggagga	420
	ggctcagggg gaggcggaag cgatatccag gtcacccagt ctccctcctc gctgtccgcc	480
	tccgtgggcg accgcgtcac cactacttgc cgggcgtcgc agtcgatcag ctctacctg	540
	aactggTacc agcagaagcc tggaaaggcc ccgaagctgc tgatctacgc ggctcgtcc	600
	ctgcaaagcg gcgtcccgtc gcggttcagc ggttccgggt ccggaaccga cttaccctg	660
30	actatttcct ccctgcaacc cgaggatttc gccacttact actgccagca gtctactcc	720
	acccacctc tgaccttcgg ccaaggaacc aaggTcgaaa tcaag	765
	<210> 64	
	<211> 741	
	<212> ДНК	
35	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид"	
40	<400> 64	
	caagtgcaac tcgtccagtc cggTgcagaa gtgaaaaaga gcggagcctc agtgaaagtg	60
	tcttgcaagg cctccggTta cccttTcact ggatactaca ttcagtgggt ccgccaagcc	120
	ccgggacagg gtctggagtg gatggggTgg attgacccta actcgggaaa tacgggatac	180
	gcgcagaagt tccaggggccg cgtgaccatg accaggaaca cctcgatcag caccgcctac	240
45	atggaactgt cctccctgcg gtcggaggat actgccgtgt actactgcg ctccgattcc	300
	tatgggtact actacggaat ggacgtctgg ggacagggca ccctcgtgac cgtgtcctcg	360
	ggaggcggag ggagcggcg gggTggatcg ggaggaggcg gctccggcg cggcggtagc	420
	gacatccaga tgaccagtc accatcaagc cttagcgcct ccgtgggcga cagagtgaca	480

ttcacttgctc gggcgtccca gggaatctcc tccgctctgg cttggatatca gcagaagcct 540
 gggaagcctc cgaagctggt gatctacgac gcgagcagcc tggaatcagg ggtgccctcc 600
 cggttttccg ggtccggttc tggcaccgat ttaccctga ccatttcgtc cctccaaccc 660
 gaggacttcg ccacttacta ctgccagcag ttcaacaact acccgctgac cttcggagga 720
 5 ggcactaagg tcgagatcaa g 741
 <210> 65
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 10 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 полипептид"
 <400> 65
 15 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 20 35 40 45
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 25 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Leu Glu Met Ala Thr Ile Met Gly Gly Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 30 115 120
 <210> 66
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 35 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 полипептид"
 <400> 66
 40 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 45 35 40 45
 Ser Leu Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

RU 2 741 120 C2

	65					70					75					80
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Val	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
	Ala	Arg	Val	Phe	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Lys	Gly	Thr
5				100					105					110		
	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
				115												
	<210>	67														
	<211>	125														
10	<212>	PRT														
	<213>	Искусственная последовательность														
	<220>															
	<221>	источник														
	<223>	/примечание="Описание Искусственная последовательность: синтетический														
15		полипептид"														
	<400>	67														
	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu
	1				5					10					15	
	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser
20				20					25					30		
	Ser	Tyr	Tyr	Trp	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
				35				40					45			
	Trp	Ile	Gly	Ser	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser
		50					55					60				
25	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Ser	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe
	65						70				75					80
	Ser	Leu	Lys	Leu	Lys	Tyr	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
					85					90					95	
	Cys	Ala	Thr	Pro	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Phe	Leu	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Pro
30				100					105					110		
	Phe	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
				115					120					125		
	<210>	68														
	<211>	116														
35	<212>	PRT														
	<213>	Искусственная последовательность														
	<220>															
	<221>	источник														
	<223>	/примечание="Описание Искусственная последовательность: синтетический														
40		полипептид"														
	<400>	68														
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
45				20					25					30		
	Trp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
				35				40					45			
	Ala	Asn	Ile	Asn	Glu	Asp	Gly	Ser	Ala	Lys	Phe	Tyr	Val	Asp	Ser	Val

50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 5 85 90 95
 Ala Arg Asp Leu Arg Ser Gly Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115
 10 <210> 69
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 15 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 полипептид"
 <400> 69
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Glu
 20 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Pro Val Arg Ser Gly
 20 25 30
 Ser His Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 25 Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Glu Asn Arg Val Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Asn Asn His Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Leu Tyr Phe
 30 85 90 95
 Cys Ala Arg Gly Thr Ala Thr Phe Asp Trp Asn Phe Pro Phe Asp Ser
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 35 <210> 70
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 40 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 полипептид"
 <400> 70
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 45 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45
 Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 5 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly Ser Gly Leu Val Val Tyr Ala Ile Arg Val Gly Ser Gly Trp
 100 105 110
 10 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 <210> 71
 <211> 129
 <212> PRT
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 полипептид"
 20 <400> 71
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 25 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 30 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Pro Ser Ser Ser Gly Ser Tyr Tyr Met Glu Asp Ser Tyr
 100 105 110
 35 Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser
 <210> 72
 <211> 117
 40 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 полипептид"
 45 <400> 72
 Gln Val Asn Leu Arg Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

RU 2 741 120 C2

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
5 Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
10 85 90 95
Ala Arg Glu Ala Leu Gly Ser Ser Trp Glu Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115
15 <210> 73
<211> 119
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
20 <221> источник
<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
полипептид"
<400> 73
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Glu Pro Gly Ala
25 1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Pro Ala Asn Thr Phe Ser Asp His
20 25 30
Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Phe Glu Trp Met
35 40 45
30 Gly Tyr Ile His Ala Ala Asn Gly Gly Thr His Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Asp Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35 85 90 95
Ala Arg Gly Gly Tyr Asn Ser Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115
40 <210> 74
<211> 121
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
45 <221> источник
<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
полипептид"
<400> 74

RU 2 741 120 C2

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
5 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
10 65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Leu Ser Val Arg Ala Ile Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110
15 Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 75
<211> 119
<212> PRT
20 <213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
полипептид"
25 <400> 75
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Ser Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Ser Tyr
20 25 30
30 Gly Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Leu Ile Glu Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ser Lys Ser Thr Leu Tyr
35 65 70 75 80
Leu Gln Met Asp Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Gly Asn Glu Asp Leu Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110
40 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 76
<211> 127
<212> PRT
45 <213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический

полипептид"

<400> 76

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Val Ser Ser Asn

20 25 30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys

10 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu

65 70 75 80

Gln Met Asn Arg Leu Thr Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

15 Arg Asp Arg Leu Tyr Cys Gly Asn Asn Cys Tyr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr

100 105 110

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 77

20 <211> 120

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

25 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полипептид"

<400> 77

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Ser Gly Ala

1 5 10 15

30 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Pro Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

Tyr Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe

35 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

40 Ala Ser Asp Ser Tyr Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 78

45 <211> 112

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полипептид"

<400> 78

```

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

```

<210> 79

20 <211> 112

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

25 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полипептид"

<400> 79

```

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

```

<210> 80

<211> 107

<212> PRT

45 <213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический

полипептид"

<400> 80

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

5 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

10 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

15 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 81

<211> 108

<212> PRT

20 <213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полипептид"

25 <400> 81

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Gly Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ser

20 25 30

30 Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

35 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

85 90 95

Pro Thr Phe Gly Leu Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

40 <210> 82

<211> 107

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

45 <221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полипептид"

<400> 82

RU 2 741 120 C2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
5 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
10 65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105
15 <210> 83
<211> 108
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
20 <221> источник
<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
полипептид"
<400> 83
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
25 1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Met
35 40 45
30 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro
35 85 90 95
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105
<210> 84
<211> 111
40 <212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
45 полипептид"
<400> 84
Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn
 20 25 30
 Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Thr Val
 35 40 45
 5 Ile Tyr Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
 65 70 75 80
 Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser
 10 85 90 95
 Ser Asn Gln Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110
 <210> 85
 <211> 107
 15 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 20 полипептид"
 <400> 85
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 25 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 30 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 35 100 105
 <210> 86
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 40 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 полипептид"
 <400> 86
 45 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Asn Gly
 50 55 60
 5 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 10 100 105
 <210> 87
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 15 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 полипептид"
 <400> 87
 20 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 25 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 30 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Tyr Ser Thr Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 88
 35 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 40 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 полипептид"
 <400> 88
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 45 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Phe Ile Lys Lys Asn
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Asn Arg Ser Gly Thr Thr Phe Ser Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 5 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asp Asn Leu Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 89
 10 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 15 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 полипептид"
 <400> 89
 Asp Ile Gln Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 20 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 25 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro
 85 90 95
 30 Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 90
 <211> 107
 <212> PRT
 35 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 полипептид"
 40 <400> 90
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Phe Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
 20 25 30
 45 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Asn Tyr Pro Leu
85 90 95
5 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 91
<211> 491
<212> PRT
10 <213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
полипептид"
15 <400> 91
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val
20 25 30
Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly
35 40 45
Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn
25 65 70 75 80
Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser
85 90 95
Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr
100 105 110
30 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Leu Glu Met Ala Thr Ile Met Gly
115 120 125
Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
130 135 140
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu
35 145 150 155 160
Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile
165 170 175
Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
180 185 190
40 Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp
195 200 205
Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys
210 215 220
Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp
45 225 230 235 240
Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Leu Asp
245 250 255
Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Thr Thr Thr Pro

	260	265	270
	Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro	Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu	
	275	280	285
5	Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His		
	290	295	300
	Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu		
	305	310	315
	Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr		
	325	330	335
10	Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe		
	340	345	350
	Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg		
	355	360	365
15	Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser		
	370	375	380
	Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr		
	385	390	395
	Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys		
	405	410	415
20	Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn		
	420	425	430
	Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu		
	435	440	445
25	Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly		
	450	455	460
	His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr		
	465	470	475
	Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
	485	490	
30	<210> 92		
	<211> 489		
	<212> PRT		
	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
35	<221> источник		
	<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полипептид"		
	<400> 92		
	Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu		
40	1	5	10
	His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val		
	20	25	30
	Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe		
	35	40	45
45	Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys		
	50	55	60
	Gly Leu Glu Trp Val Ser Leu Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr		
	65	70	75
			80

RU 2741 120 C2

	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser
					85					90					95	
	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Val	Glu	Asp	Thr
				100					105					110		
5	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Val	Phe	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Met	Asp	Val
			115					120					125			
	Trp	Gly	Lys	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
		130					135					140				
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln
10	145					150					155					160
	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly	Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser
				165					170					175		
	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	Tyr	Thr	Asp	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu
			180						185					190		
15	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Arg	Arg	Leu	Ile	Tyr
		195						200					205			
	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Asp	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
		210						215				220				
	Gly	Ser	Asp	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu
20	225					230					235					240
	Asp	Val	Gly	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	Gly	Thr	His	Trp	Ser	Phe	Thr
				245						250					255	
	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro
			260						265					270		
25	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu
		275						280					285			
	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg
		290					295					300				
	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly
30	305				310						315					320
	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys
				325						330					335	
	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg
			340						345					350		
35	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro
		355						360					365			
	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser
		370				375					380					
	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Lys	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu
40	385					390					395					400
	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg
				405						410				415		
	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln
			420						425					430		
45	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr
		435					440					445				
	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp
		450					455					460				

Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
 465 470 475 480
 Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485

5 <210> 93
 <211> 491
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 10 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 полипептид"
 <400> 93
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 15 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu
 20 20 25 30
 Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly
 35 40 45
 20 Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro
 50 55 60
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr
 65 70 75 80
 Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Ser Ile Ser Val Asp Thr
 25 85 90 95
 Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Lys Tyr Val Thr Ala Ala Asp
 100 105 110
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Pro Gly Thr Tyr Tyr Asp Phe Leu
 115 120 125
 30 Ser Gly Tyr Tyr Pro Phe Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 130 135 140
 Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 145 150 155 160
 Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 35 165 170 175
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser
 180 185 190
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
 195 200 205
 40 Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 210 215 220
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 225 230 235 240
 Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro
 45 245 250 255
 Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro
 260 265 270
 Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu

RU 2 741 120 C2

	275		280		285												
	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	
	290						295					300					
5	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	
	305					310					315					320	
	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	
					325					330					335		
	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	
				340					345					350			
10	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	
		355						360				365					
	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	
	370					375					380						
15	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Lys	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	
	385				390					395					400		
	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	
				405					410					415			
	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	
			420					425				430					
20	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	
		435					440					445					
	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	
	450				455					460							
25	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	
	465				470				475						480		
	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg						
				485				490									
	<210>	94															
	<211>	483															
30	<212>	PRT															
	<213>	Искусственная последовательность															
	<220>																
	<221>	источник															
	<223>	/примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический															
35	полипептид"																
	<400>	94															
	Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	
	1			5						10				15			
40	His	Ala	Ala	Arg	Pro	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	
			20					25					30				
	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	
		35				40					45						
	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Trp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	
	50				55				60								
45	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Asn	Ile	Asn	Glu	Asp	Gly	Ser	Ala	Lys	Phe	
	65			70					75					80			
	Tyr	Val	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	
				85				90						95			

RU 2741 120 C2

	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr
				100					105					110		
	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Asp	Leu	Arg	Ser	Gly	Arg	Tyr	Trp	Gly
				115				120					125			
5	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
				130				135				140				
	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro
	145						150				155					160
	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Gly	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg
10					165					170					175	
	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Gly	Ser	Phe	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys
				180					185					190		
	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala
				195				200				205				
15	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
				210				215				220				
	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr
	225					230				235						240
	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Ser	Ser	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Leu	Gly	Thr	Lys
20					245					250					255	
	Leu	Glu	Ile	Lys	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala
				260					265					270		
	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg
				275				280				285				
25	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys
				290				295				300				
	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu
	305					310				315						320
	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu
30					325					330					335	
	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln
				340					345					350		
	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly
				355				360				365				
35	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr
				370				375				380				
	Lys	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg
	385					390				395						400
	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met
40					405					410					415	
	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu
				420				425				430				
	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys
				435				440				445				
45	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu
				450				455				460				
	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu
	465					470					475					480

Pro Pro Arg
 <210> 95
 <211> 489
 <212> PRT
 5 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полипептид"
 10 <400> 95
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu
 20 25 30
 15 Val Arg Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly
 35 40 45
 Pro Val Arg Ser Gly Ser His Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro
 50 55 60
 Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr
 20 65 70 75 80
 Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Glu Asn Arg Val Thr Ile Ser Ile Asp Thr
 85 90 95
 Ser Asn Asn His Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp
 100 105 110
 25 Thr Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Thr Ala Thr Phe Asp Trp Asn
 115 120 125
 Phe Pro Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ser Asp
 30 145 150 155 160
 Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile Gly Asp
 165 170 175
 Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu
 180 185 190
 35 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 195 200 205
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 210 215 220
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 40 225 230 235 240
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
 245 250 255
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro Ala Pro
 260 265 270
 45 Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu
 275 280 285
 Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg
 290 295 300

RU 2741 120 C2

Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly
305 310 315 320
Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys
325 330 335
5 Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg
340 345 350
Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro
355 360 365
10 Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
370 375 380
Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
385 390 395 400
Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
405 410 415
15 Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln
420 425 430
Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
435 440 445
Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
20 450 455 460
Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
465 470 475 480
Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485
25 <210> 96
<211> 493
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
30 <221> источник
<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
полипептид"
<400> 96
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
35 1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Gly Leu
20 25 30
Leu Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly
35 40 45
40 Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Val Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr
65 70 75 80
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
45 85 90 95
Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
100 105 110
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Gly Leu Val Val Tyr Ala Ile Arg

RU 2 741 120 C2

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

<210> 97

<211> 499

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

5 <221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полипептид"

<400> 97

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

RU 2 741 120 C2

	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu
					325					330					335	
	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu
				340					345					350		
5	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln
			355				360						365			
	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly
			370				375						380			
	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr
10		385				390				395						400
	Lys	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg
				405					410						415	
	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met
				420					425					430		
15	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu
			435					440					445			
	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys
			450				455					460				
	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu
20		465				470				475						480
	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu
				485					490					495		
	Pro	Pro	Arg													
	<210>	98														
25	<211>	483														
	<212>	PRT														
	<213>	Искусственная последовательность														
	<220>															
	<221>	источник														
30	<223>	/примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полипептид"														
	<400>	98														
	Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu
	1				5					10					15	
35	His	Ala	Ala	Arg	Pro	Gln	Val	Asn	Leu	Arg	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu
				20					25					30		
	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe
			35					40					45			
	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Glu	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys
40		50					55				60					
	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Tyr	Ile	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Thr	Ile	Tyr
	65					70				75					80	
	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala
				85					90					95		
45	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr
				100					105					110		
	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Ala	Leu	Gly	Ser	Ser	Trp	Glu	Trp
			115					120						125		

RU 2 741 120 C2

	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
	130						135				140					
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser
	145					150					155					160
5	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys
					165					170					175	
	Gln	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Asn	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys
				180					185					190		
	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu
10			195					200					205			
	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
	210						215						220			
	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr
	225					230					235					240
15	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asp	Asn	Leu	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys
					245					250					255	
	Leu	Glu	Ile	Lys	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala
				260					265					270		
	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg
20			275					280					285			
	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys
	290					295						300				
	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu
	305					310				315						320
25	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu
					325					330					335	
	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln
				340				345						350		
	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly
30			355					360					365			
	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr
	370					375					380					
	Lys	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg
	385					390				395						400
35	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met
				405					410						415	
	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu
			420					425					430			
	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys
40			435					440					445			
	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu
	450					455					460					
	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu
	465					470					475					480
45	Pro	Pro	Arg													
	<210>	99														
	<211>	490														
	<212>	PRT														

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полипептид"

5

<400> 99

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

RU 2 741 120 C2

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 340 345 350
 Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 355 360 365
 5 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
 370 375 380
 Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
 385 390 395 400
 Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
 10 405 410 415
 Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
 420 425 430
 Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
 435 440 445
 15 Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
 450 455 460
 Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
 465 470 475 480
 Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 20 485 490
 <210> 100
 <211> 492
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 25 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 полипептид"
 <400> 100
 30 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu
 20 25 30
 Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 35 35 40 45
 Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr
 65 70 75 80
 40 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
 85 90 95
 Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 100 105 110
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Leu Ser Val Arg Ala Ile Asp Ala
 45 115 120 125
 Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

RU 2741120 C2

	145		150		155		160
	Gly Ser Asp Ile Val	Leu Thr Gln Ser Pro	Ser Ser Leu Ser Ala Ser				
		165		170		175	
	Val Gly Asp Arg Val	Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser	Gln Asp Ile Ser				
5		180		185		190	
	Asn Tyr Leu Asn Trp	Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys	Ala Pro Lys Leu				
		195		200		205	
	Leu Ile Tyr Asp Ala	Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val	Pro Ser Arg Phe				
		210		215		220	
10	Ser Gly Ser Gly Ser	Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr	Ile Ser Ser Leu				
		225		230		235	
	Gln Pro Glu Asp Phe	Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln	Ala Tyr Ser Thr				
		245		250		255	
	Pro Phe Thr Phe Gly	Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	Thr Thr Thr				
15		260		265		270	
	Pro Ala Pro Arg Pro	Pro Thr Pro Ala Pro Thr	Ile Ala Ser Gln Pro				
		275		280		285	
	Leu Ser Leu Arg Pro	Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala	Gly Gly Ala Val				
		290		295		300	
20	His Thr Arg Gly Leu	Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile	Trp Ala Pro				
		305		310		315	
	Leu Ala Gly Thr Cys	Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val	Ile Thr Leu				
		325		330		335	
	Tyr Cys Lys Arg Gly	Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe	Lys Gln Pro				
25		340		345		350	
	Phe Met Arg Pro Val	Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly	Cys Ser Cys				
		355		360		365	
	Arg Phe Pro Glu Glu	Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg	Val Lys Phe				
		370		375		380	
30	Ser Arg Ser Ala Asp	Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln	Asn Gln Leu				
		385		390		395	
	Tyr Asn Glu Leu Asn	Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp	Val Leu Asp				
		405		410		415	
	Lys Arg Arg Gly Arg	Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro	Arg Arg Lys				
35		420		425		430	
	Asn Pro Gln Glu Gly	Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp	Lys Met Ala				
		435		440		445	
	Glu Ala Tyr Ser Glu	Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg	Arg Gly Lys				
		450		455		460	
40	Gly His Asp Gly Leu	Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr	Lys Asp Thr				
		465		470		475	
	Tyr Asp Ala Leu His	Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg					
		485		490			
	<210>	101					
45	<211>	490					
	<212>	PRT					
	<213>	Искусственная последовательность					
	<220>						

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полипептид"

<400> 101

```

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

```

RU 2 741 120 C2

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
355 360 365
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
370 375 380
5 Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
385 390 395 400
Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
405 410 415
Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
10 420 425 430
Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
435 440 445
Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
450 455 460
15 Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
465 470 475 480
Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485 490
<210> 102
20 <211> 499
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник
25 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
полипептид"
<400> 102
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
30 His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30
Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45
Asn Val Ser Ser Asn Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
35 50 55 60
Gly Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr
65 70 75 80
Gly Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys
85 90 95
40 Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Arg Leu Thr Ala Glu Asp Thr Ala
100 105 110
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Leu Tyr Cys Gly Asn Asn Cys Tyr
115 120 125
Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
45 130 135 140
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
145 150 155 160
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Val Thr Gln Ser Pro

RU 2741 120 C2

				165					170					175			
	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	
				180					185					190			
5	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	
			195					200					205				
	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	
		210					215					220					
	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	
	225					230					235					240	
10	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	
				245					250					255			
	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Thr	Pro	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	
			260						265				270				
15	Val	Glu	Ile	Lys	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	
		275						280				285					
	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	
		290					295				300						
	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	
	305				310					315					320		
20	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	
				325					330					335			
	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	
			340						345				350				
25	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	
		355						360				365					
	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	
		370					375				380						
	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	
	385				390				395					400			
30	Lys	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	
				405					410					415			
	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	
			420						425				430				
	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	
35			435					440				445					
	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	
		450				455					460						
	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	
	465				470				475						480		
40	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	
				485					490					495			
	Pro	Pro	Arg														
	<210>	103															
	<211>	491															
45	<212>	PRT															
	<213>	Искусственная последовательность															
	<220>																
	<221>	источник															

<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полипептид"

<400> 103

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

	355	360	365	
	Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser			
	370	375	380	
5	Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr			
	385	390	395	400
	Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys			
	405	410	415	
	Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn			
	420	425	430	
10	Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu			
	435	440	445	
	Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly			
	450	455	460	
15	His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr			
	465	470	475	480
	Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
	485	490		
	<210> 104			
	<211> 1473			
20	<212> ДНК			
	<213> Искусственная последовательность			
	<220>			
	<221> источник			
	<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический			
25	полинуклеотид"			
	<400> 104			
	atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg			60
	cccgaagtgc aactccaaca gtcaggcgca gaagtcaaga agcccggatc gtcagtga			120
	gtgtcctgca aagcctccgg cggaaccttc agctcctacg caatcagctg ggtgcggcag			180
30	gcgcccggac agggactgga gtggatgggc ggtatcattc cgatctttgg caccgccaat			240
	tacgcccaga agttccaggg acgcgtcaca atcaccgccg acgaatcgac ttccaccgcc			300
	tacatggagc tgtcgtcctt gaggagcgaa gataccgccg tgtactactg cgctcgggat			360
	ctggagatgg ccactatcat ggggggttac tggggccagg ggaccctggt cactgtgtcc			420
	tcgggaggag ggggatcagg cggcggcggt tccgggggag gaggaagcca gtccgcgctg			480
35	actcagccag cttccgtgtc tggttcgccg ggacagtcca tcactattag ctgtaccggc			540
	accagcagcg acgtgggcgg ctacaactat gtgtcatggt accagcagca cccggggaag			600
	gcgcctaagc tgatgatcta cgacgtgtcc aaccgcccta gcggagtgtc caacagattc			660
	tccggttcga agtcaggga cactgcctcc ctcacgatta gcgggctgca agccgaggat			720
	gaagccgact actactgtc ctcctatacc tcctcctcga ccctggacgt ggtgttcgga			780
40	ggaggcacca agctcaccgt ccttaccact accccagcac cgaggccacc caccgccggt			840
	cctaccatcg cctcccagcc tctgtccctg cgtccggagg catgtagacc cgcagctggt			900
	ggggccgtgc ataccggggg tcttgacttc gcctgcgata tctacatttg ggcccctctg			960
	gctggtactt gcggggtcct gctgctttca ctcgtgatca ctctttactg taagcgcggt			1020
	cggaagaagc tgctgtacat ctttaagcaa cccttcatga ggctgtgca gactactcaa			1080
45	gaggaggacg gctgttcatg ccggttccca gaggaggagg aaggcggctg cgaactgcgc			1140
	gtgaaattca gccgcagcgc agatgctcca gcctacaagc aggggcagaa ccagctctac			1200
	aacgaactca atcttggtcg gagagaggag tacgacgtgc tggacaagcg gagaggacgg			1260
	gaccagaaaa tgggcgggaa gccgcgcaga aagaatcccc aagagggcct gtacaacgag			1320

	ctccaaaagg ataagatggc agaagcctat agcgagattg gtatgaaagg ggaacgcaga	1380
	agaggcaaaag gccacgacgg actgtaccag ggactcagca ccgccacca ggacacctat	1440
	gacgctcttc acatgcaggc cctgccgcct cgg	1473
	<210> 105	
5	<211> 1467	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<221> источник	
10	<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид"	
	<400> 105	
	atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg	60
	cccgaagtgc aattggtgga aagcggagga ggagtgggtc aacctggagg aagcctgaga	120
15	ctgtcatgtg ccgcctcggg attcactttc gatgactacg caatgcactg ggtccgccag	180
	gcccccgga aggggtctgga atgggtgtcc ctcatctccg gcgatggggg ttccacttac	240
	tatgcggatt ctgtgaaggg ccgcttcaca atctcccggg acaattccaa gaacactctg	300
	taccttcaaa tgaactccct gaggggtggag gacaccgctg tgtactactg cgcgagagtg	360
	tttgactcgt actatatgga cgtctgggga aagggcacca ccgtgaccgt gtccagcggg	420
20	ggcgggtggat cggggggcg cggctccggg agcggagggt ccgagattgt gctgactcag	480
	tcgccgttgt cactgcctgt caccgccggg cagccggcct ccatttcatt ccggtccagc	540
	cagtccctgg tctacaccga tgggaacact tacctcaact ggttcagca gcgccagga	600
	cagtccccgc ggaggctgat ctacaaagtg tcaaaccggg actccggcgt ccccgatcgg	660
	ttctcgggaa gcggcgagcga caccgacttc acgctgaaga tttcccgcgt ggaagccgag	720
25	gacgtgggca tctactactg tatgcagggc acccactggt cgtttacctt cggacaagga	780
	actaggctcg agatcaagac cactacccca gcaccgaggc caccacccc ggctcctacc	840
	atcgccctcc agcctctgtc cctgcgtccg gaggcattga gaccgcagc tgggtggggcc	900
	gtgcataccc ggggtcttga cttcgcctgc gatattctaca tttgggcccc tctggctggt	960
	acttgccggg tcctgctgct ttactcgtg atcactcttt actgtaagcg cggtcggaag	1020
30	aagctgctgt acatctttaa gcaacccttc atgaggcctg tgcagactac tcaagaggag	1080
	gacggctggt catgccggtt ccagaggag gaggaaggcg gctgcgaact gcgcgtgaaa	1140
	ttcagccgca gcgcagatgc tccagcctac aagcaggggc agaaccagct ctacaacgaa	1200
	ctcaatcttg gtcggagaga ggagtacgac gtgctggaca agcggagagg acgggaccca	1260
	gaaatgggcg ggaagccgcg cagaaagaat cccaagagg gcctgtacaa cgagctccaa	1320
35	aaggataaga tggcagaagc ctatagcgag attggtatga aaggggaacg cagaagaggc	1380
	aaaggccacg acggactgta ccagggactc agcaccgcca ccaaggacac ctatgacgt	1440
	cttcacatgc aggccctgcc gcctcgg	1467
	<210> 106	
	<211> 1473	
40	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид"	
45	<400> 106	
	atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg	60
	ccccaaagtgc agcttcaaga aagcgggtcca ggactcgtca agccatcaga aactctttcc	120

	ctcacttgta	ccgtgtcggg	aggcagcatc	tcctcgagct	cctactactg	gggttgatt	180
	agacagcccc	cgggaaaggg	gttgagtg	atcggttcca	tctactactc	cggtcgacc	240
	tactacaacc	cttccctgaa	atctcgggtg	tccatctccg	tcgacacctc	caagaaccag	300
	ttcagcctga	agctgaaata	tgtgaccg	gccgatactg	ccgtgtacta	ttgcgccacc	360
5	ccgggaacct	actacgactt	cctctcgggg	tactaccctg	tttactgggg	acaggggact	420
	ctcgtgaccg	tgtcctcggg	cggcggaggt	tcaggcgggtg	gcggatcggg	gggaggaggc	480
	tcagacattg	tgatgacca	gagcccgctc	agcctgagcg	cctccgtggg	cgatagggtc	540
	acgattactt	gccgggctgc	ccagggaatc	tcaagctacc	tggcctggta	ccaacagaag	600
	cccggaaagg	cacccaagtt	gctgatctat	gccgctagca	ctctgcagtc	cggggtgcct	660
10	ttccgcttct	ccggtctccg	ctcgggcacc	gacttcaccc	tgaccatttc	ctcactgcaa	720
	cccaggagact	tcgccactta	ctactgccag	cagctgaact	cctaccctta	cacattcgga	780
	cagggaacca	agctggaaat	caagaccact	accccagcac	cgaggccacc	caccccggtc	840
	cctaccatcg	cctcccagcc	tctgtccctg	cgccggagg	catgtagacc	cgagctggt	900
	ggggccgtgc	ataccgggg	tcttgacttc	gcctgcgata	tctacatttg	ggccctctg	960
15	gctggtactt	gcggggctct	gctgctttca	ctcgtgatca	ctctttactg	taagcgcggt	1020
	cggaagaagc	tgctgtacat	ctttaagcaa	cccttcatga	ggcctgtgca	gactactcaa	1080
	gaggaggacg	gctgttcatg	ccggttccca	gaggaggagg	aaggcggtg	cgaactgcgc	1140
	gtgaaattca	gccgcagcgc	agatgctcca	gcctacaagc	aggggcagaa	ccagctctac	1200
	aacgaactca	atcttggtcg	gagagaggag	tacgacgtgc	tggacaagcg	gagaggacgg	1260
20	gaccagaaa	tgggcgggaa	gccgcgcaga	aagaatcccc	aagagggcct	gtacaacgag	1320
	ctccaaaagg	ataagatggc	agaagcctat	agcgagattg	gtatgaaagg	ggaacgcaga	1380
	agaggcaaag	gccacgacgg	actgtaccag	ggactcagca	ccgccaccaa	ggacacctat	1440
	gacgtcttct	acatgcaggc	cctgccgcct	cgg			1473
	<210> 107						
25	<211> 1449						
	<212> ДНК						
	<213> Искусственная последовательность						
	<220>						
	<221> источник						
30	<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид"						
	<400> 107						
	atggccctcc	ctgtcaccgc	cctgctgctt	ccgctggctc	ttctgctcca	cgccgctcgg	60
	ccccaaagtgc	aactcgtgga	atctgggtgga	ggactcgtgc	aacccggagg	atcattgcga	120
35	ctctcgtgtg	cggcacccgg	ctttaccttt	tcacccact	ggatgtcctg	ggtcagacag	180
	gcccccgga	agggactgga	atgggtcgcg	aacatcaacg	aggacggctc	ggccaagtgc	240
	tacgtggact	ccgtgaagg	ccgcttcacg	atctcacggg	ataacgcca	gaattccctg	300
	tatctgcaaa	tgaacagcct	gagggccgag	gacactgcgg	tgtacttctg	cgcacgcgac	360
	ctgagggtccg	ggagatactg	gggacagggc	accctcgtga	ccgtgtcgag	cggaggagg	420
40	gggtcggg	gcggcggttc	cggtggcggc	ggtagcga	ttgtgttgac	ccagtccct	480
	ggaaccctga	gcctgtcacc	tggaggacgc	gccaccctgt	cctgccgggc	cagccagagc	540
	atctcaggg	ccttcctggc	ttggtaccag	cagaagccgg	gacaggctcc	gagacttctg	600
	atctacggcg	cctcctcgcg	ggcgaccgga	atcccggtac	ggttctccgg	ctcgggaagc	660
	ggaactgact	tactctttac	catttcccg	ctggagccgg	aagatttcgc	cgtgtactac	720
45	tgccagcagt	acgggtcatc	ccctccaacc	ttcggcctgg	gaactaagct	ggaaatcaaa	780
	accactaccc	cagcaccgag	gccaccaccc	ccggctccta	ccatcgctc	ccagcctctg	840
	tccttgctgc	cggaggcatg	tagaccgcga	gctgggtggg	ccgtgcatac	ccgggtctct	900
	gacttcgcct	gcgatatcta	catttgggcc	cctctggctg	gtacttgcg	ggtcctgctg	960

	ctttcactcg	tgatcactct	ttactgtaag	cgcggtcggg	agaagctgct	gtacatcttt	1020
	aagcaaccct	tcatgaggcc	tgtgcagact	actcaagagg	aggacggctg	ttcatgccgg	1080
	ttcccagagg	aggaggaagg	cggtctcgaa	ctgcgcgtga	aattcagccg	cagcgcagat	1140
	gctccagcct	acaagcaggg	gcagaaccag	ctctacaacg	aactcaatct	tggtcggaga	1200
5	gaggagtacg	acgtgctgga	caagcggaga	ggacgggacc	cagaaatggg	cggaagccg	1260
	cgcagaaaga	atccccaaga	gggcctgtac	aacgagctcc	aaaaggataa	gatggcagaa	1320
	gcctatagcg	agattgggtat	gaaaggggaa	cgcagaagag	gcaaaggcca	cgacggactg	1380
	taccagggac	tcagcaccgc	caccaaggac	acctatgacg	ctcttcacat	gcaggccctg	1440
	ccgcctcgg						1449
10	<210>	108					
	<211>	1467					
	<212>	ДНК					
	<213>	Искусственная последовательность					
	<220>						
15	<221>	источник					
	<223>	/примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид"					
	<400>	108					
	atggccctcc	ctgtcaccgc	cctgctgctt	ccgctggctc	ttctgctcca	cgccgctcgg	60
20	cccgaagtgc	aactccaaca	atccgggtcca	ggactcgtca	gacctctcca	aactctctcg	120
	cttacatgca	ctgtgtccgg	cggtccctgtg	cggtccggct	ctcattactg	gaactggatt	180
	cgccagcccc	cgggacgcgg	actggagtgg	atcggctaca	tctattactc	ggggctcgact	240
	aactacaacc	cgagcctgga	aaatagagtg	accatctcaa	tcgacacgtc	caacaaccac	300
	ttctcgctga	agttgtcctc	cgtgactgcc	gccgatactg	ccctgtactt	ctgtgctcgc	360
25	ggaaccgcca	ccttcgactg	gaacttccct	tttgactcat	ggggccaggg	gaccttgtg	420
	accgtgtcca	gcgaggagg	aggctccgg	ggtggcggga	gcggtagcgg	cggaagcgac	480
	atccagatga	cccagtcacc	gtcctcgctg	tccgcatcca	ttggggatcg	ggcactatt	540
	acttgccggg	cgtcccagtc	catctcgctc	tacctgaact	ggtatcagca	gaagccaggg	600
	aaagccccc	agctgctgat	ctacgcggcc	agcagcctgc	agtcaggagt	gccttcaagg	660
30	tttagcggca	gcggatcggg	aaccgacttc	accctgacca	tttctctcct	ccaaccgag	720
	gatttcgcca	cctactactg	ccagcagtcc	tactccaccc	cgtggacctt	cggaaggga	780
	accaagctgg	agatcaagac	cactacccca	gcaccgaggc	caccacccc	ggctcctacc	840
	atgcctccc	agcctctgtc	cctgcgtccg	gaggcatgta	gaccgcagc	tggtggggcc	900
	gtgcataccc	gggtgtctga	cttcgcctgc	gatatctaca	tttggggccc	tctggctggt	960
35	acttgccggg	tcctgctgct	ttactcgtg	atcactcttt	actgtaagcg	cggtcggaa	1020
	aagctgctgt	acatctttaa	gcaacccttc	atgaggcctg	tgcaactac	tcaagaggag	1080
	gacggctggt	catgccgggt	cccagaggag	gaggaaggcg	gctgcgaact	gcgcgtgaaa	1140
	ttcagccgca	gcgagatgc	tccagcctac	aagcaggggc	agaaccagct	ctacaacgaa	1200
	ctcaatcttg	gtcggagaga	ggagtacgac	gtgctggaca	agcggagagg	acgggaccca	1260
40	gaaatggg	ggaagccg	cagaaagaat	ccccagagg	gcctgtacaa	cgagctccaa	1320
	aaggataaga	tggcagaagc	ctatagcgag	attgggtatga	aaggggaacg	cagaagaggc	1380
	aaaggccacg	acggactgta	ccagggactc	agcaccgcca	ccaaggacac	ctatgacgct	1440
	cttcacatgc	aggccctgcc	gcctcgg				1467
	<210>	109					
45	<211>	1479					
	<212>	ДНК					
	<213>	Искусственная последовательность					
	<220>						

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид"

<400> 109

5	atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg	60
	ccccaaagtgc aacttcaaga atcaggcgca ggacttctca agccatccga aacactctcc	120
	ctcacttgcg cgggtgtacgg gggaagcttc tcgggatact actggtcctg gattaggcag	180
	cctcccggca aaggcctgga atgggtcggg gagatcaacc actccggttc aaccaactac	240
	aaccgcgtcg tgaagtcccg cgtgaccatt tccgtggaca cctctaagaa tcagttcagc	300
10	ctgaagctct cgtccgtgac cgcggcggac accgccgtct actactgcg cgggggatca	360
	ggactggtgg tgtacgccat ccgcgtgggc tcgggctggt tcgattactg gggccaggga	420
	accctggtca ctgtgtcgtc cggcggagga gggtcggggg gcggagacag cgggtggagg	480
	ggtagcgcaca tccagatgac ccagtccccg tcctcgtgt ccgcctccgt gggagataga	540
	gtgaccatca cctgtcgggc atcccagagc atttccagct acctgaactg gtatcagcag	600
15	aagcccggaa agggccccta gctgttgatg tacgccgcca gcagcttgca gtcgggcgtg	660
	ccgagccggt tttccggttc cggctccggg actgacttca ccctgactat ctcatccctg	720
	caacccgagg acttcgccac ttattactgc cagcagtcct actcaacccc tccttgagc	780
	ttcggacagg gcaccaaggt cgatatcaag accactacc cagcaccgag gccaccacc	840
	ccggctccta ccatcgctc ccagcctctg tccctgcgtc cggaggcatg tagaccgca	900
20	gctggtgggg ccgtgcatac ccgggggtctt gacttcgcct gcgatatcta catttgggcc	960
	cctctggctg gtacttgcg ggctcctgctg ctttactcgt tgatcactct ttactgtaag	1020
	cgcggtcggg agaagctgct gtacatcttt aagcaaccct tcatgaggcc tgtgcagact	1080
	actcaagagg aggacggctg ttcattgccg tcccagagg aggaggaagg cggctgcgaa	1140
	ctgcgcgtga aattcagccg cagcgcagat gctccagcct acaagcaggg gcagaaccag	1200
25	ctctacaacg aactcaatct tggtcggaga gaggagtac acgtgctgga caagcggaga	1260
	ggacggggacc cagaaatggg cgggaagccg gcgagaaaaga atccccaaga gggcctgtac	1320
	aacgagctcc aaaaggataa gatggcagaa gcctatagcg agattggtat gaaaggggaa	1380
	cgcagaagag gcaaaggcca cgacggactg taccagggac tcagcaccgc caccaaggac	1440
	acctatgacg ctcttcacat gcaggccctg ccgcctcgg	1479

30 <210> 110

<211> 1497

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

35 <221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид"

<400> 110

40	atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg	60
	cccgaagtgc aattggtgga atctggagga ggacttgtga aacctggtgg aagcctgaga	120
	ctttcctgtg cggcctcggg attcactttc tcctcctact ccatgaactg ggtcagacag	180
	gcccctggga agggactgga atgggtgtca tccatctcct cctcatcgtc gtacatctac	240
	tacgccgata gcgtgaaggg gcggttcacc atttcccggg acaacgctaa gaacagcctc	300
	tatctgcaaa tgaattccct ccgcgccgag gacactgccg tgtactactg cgcgagggac	360
45	ccctcatcaa gcggcagcta ctacatggag gactcgtatt actacggaat ggacgtctgg	420
	ggccagggaa ccactgtgac ggtgtcctcc ggtggagggg gctccggggg cgggggatct	480
	ggcggaggag gctccaactt catgctgacc cagccgcact ccgtgtccga aagccccgga	540
	aagaccgtga caatttcctg caccgggtcc tccggctcga tcgcatcaaa ctacgtgcag	600

	tggtaccagc agcgcccggg cagcgccccc accactgtca tctacgagga taaccagcgg	660
	ccgtcgggtg tcccagaccg gttttccggt tgcatacgata gcagcagcaa cagcgccctcc	720
	ctgaccattt ccggcctcaa gaccgaggat gaggtctgact actactgcca gtcgtatgac	780
	tcctcgaacc aagtgggtgtt cggtggcggc accaagctga ctgtgctgac cactacccca	840
5	gcaccgaggg caccaccccc ggctcctacc atcgccctccc agcctctgtc cctgcgtccg	900
	gaggcatgta gacccgcagc tgggtggggcc gtgcataccc ggggtcttga cttcgctcgc	960
	gatatctaca tttggggcccc tctggctggt acttgcgggg tcctgctgct ttcactcgtg	1020
	atcactcttt actgtaagcg cggtcggaaag aagctgctgt acatctttaa gcaacccttc	1080
	atgaggcctg tgcagactac tcaagaggag gacggctggt catgccgggt cccagaggag	1140
10	gaggaaggcg gctgcgaact gcgcgtgaaa ttcagccgca gcgcagatgc tccagcctac	1200
	aagcaggggg agaaccagct ctacaacgaa ctcaatcttg gtcggagaga ggagtacgac	1260
	gtgctggaca agcggagagg acgggaccca gaaatggggc ggaagccgcg cagaaagaat	1320
	ccccaaagg gacctgtacaa cgagctccaa aaggataaga tggcagaagc ctatagcgag	1380
	attgggtatga aaggggaacg cagaagaggc aaaggccacg acggactgta ccagggactc	1440
15	agcaccgcca ccaaggacac ctatgacgct cttcacatgc aggccctgcc gcctcgg	1497
	<210> 111	
	<211> 1449	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
20	<220>	
	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид"	
	<400> 111	
25	atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg	60
	ccccaaagtga acctgagaga aagcggcgga ggacttgctc aacctggagg aagcctgaga	120
	ctgtcatgtg ccgcgtccgg cttcaccttc tcgtcctacg agatgaactg ggtccgccag	180
	gcaccgggca aaggactgga atgggtgtcc tacatttcct cgtccgggtc caccatctat	240
	tacgccgact ccgtgaaggg acggttcacc atctccggg acaacgcaa gaactccctc	300
30	tacctccaaa tgaactcact gagggcagag gacactgcgg tctactactg cgccgcgaa	360
	gctttgggta gctcctggga gtggggccag ggaaccactg tgaccgtgtc ctcgggtgga	420
	gggggctccg gtggcggggg ttcagggggg ggcggaagcg atatccagat gactcagtca	480
	ccaagctccc tgagcgcctc agtgggagat cgggtcacia tcacgtgcca ggcgctccag	540
	gacatttcta actacctcaa ttggtaccag cagaagccgg ggaaggcccc caagcttctg	600
35	atctacgatg cctccaacct ggaaaccggc gtgccctccc gcttctcggg atcgggcagc	660
	ggcactgact tcacctttac catctcgtcc ctgcaacctg aggacatgc cacctattac	720
	tgccagcagt acgataacct cccgctgact ttcggaggcg gaactaagct ggagattaag	780
	accactaccc cagcaccgag gccaccacc ccggctccta ccatgcctc ccagcctctg	840
	tccttgctgc cgaggcatg tagaccgcga gctgggtggg ccgtgcatac ccgggtctt	900
40	gacttcgcct gcgatatcta catttgggcc cctctggctg gtacttgctg ggtcctgctg	960
	ctttcactcg tgatcactct ttactgtaag cgcggtcgga agaagctgct gtacatcttt	1020
	aagcaaccct tcatgaggcc tgtgcagact actcaagagg aggacggctg ttcagtcagg	1080
	ttcccagagg aggaggaagg cggtgcgaa ctgcgcgtga aattcagccg cagcgcagat	1140
	gctccagcct acaagcaggg gcagaaccag ctctacaacg aactcaatct tggtcggaga	1200
45	gaggagtacg acgtgctgga caagcggaga ggacgggacc cagaaatggg cgggaagccg	1260
	cgcagaaaga atccccaaaga gggcctgtac aacgagctcc aaaaggataa gatggcagaa	1320
	gcctatagcg agattggtat gaaaggggaa cgcagaagag gcaaaggcca cgacggactg	1380
	taccagggac tcagcaccgc caccaaggac acctatgacg ctcttcacat gcaggccctg	1440

ccgcctcgg
 <210> 112
 <211> 1470
 <212> ДНК
 5 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 полинуклеотид"
 10 <400> 112
 atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg 60
 ccccaagtgc aactcgtcca gtccggtgca gaagtcaagg aaccgggagc ctccgtgaaa 120
 gtgtcctgca aagctcctgc caacactttc tcggaccacg tgatgactg ggtgcccag 180
 gcgcccggcc agcgccttca atggatggga tacattcatg ccgccaatgg cggtagccac 240
 15 tactcccaaa agttccagga tagagtcacc atcaccggg acaccagcgc caacaccgtg 300
 tatatggatc tgtccagcct gaggtccgag gataccgccg tgtactactg cgcccggggc 360
 ggatacaact cagacgcggt cgacatttgg ggacagggta ctatggtcac cgtgtcatcc 420
 gggggcggtg gcagcggggg cggaggctct ggcggaggcg gatcaggggg aggagggtcc 480
 gacatcgtga tgaccagtc cccgtcatcg gtgtccgcgt ccgtgggaga cagagtgacc 540
 20 atcacgtgtc gcgccagcca ggacatctcc tcgtggttgg catggtacca gcagaagcct 600
 ggaaaggccc cgaagctgct catctacgcc gcctcctccc ttcaatcggg agtgccctcg 660
 cggttcaacg gaagcgggaag cgggacagat ttaccctga ctattagctc gctgcagccc 720
 gaggacttcg ctacttacta ctgccaacag agctactcca cccactgac tttcgggggg 780
 ggtaccaagg tcgagatcaa gaccactacc ccagcaccga ggccaccac cccggctcct 840
 25 accatgcct cccagcctct gtccctgcgt ccggaggcat gtagaccgc agctggtggg 900
 gccgtgcata cccgggggtct tgacttcgcc tgcgatatct acatttgggc ccctctggct 960
 ggtacttgcg gggctcctgct gctttcactc gtgatcactc tttactgtaa gcgcggtcgg 1020
 aagaagctgc tgtacatctt taagcaaccc ttcatgaggc ctgtgcagac tactcaagag 1080
 gaggacggct gttcatgccg gttcccagag gaggaggaag gcggctgcga actgcgcgtg 1140
 30 aaattcagcc gcagcgcaga tgctccagcc tacaagcagg ggcagaacca gctctacaac 1200
 gaactcaatc ttggtcggag agaggagtac gacgtgctgg acaagcggag aggacgggac 1260
 ccagaaatgg gcgggaagcc gcgcagaaaag aatccccaag agggcctgta caacgagctc 1320
 caaaaggata agatggcaga agcctatagc gagattggta tgaaagggga acgcagaaga 1380
 ggcaaaggcc acgacggact gtaccaggga ctcagcaccg ccaccaagga cacctatgac 1440
 35 gctcttcaca tgcaggccct gccgcctcgg 1470
 <210> 113
 <211> 1476
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 40 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 полинуклеотид"
 <400> 113
 45 atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg 60
 ccccaagtgc aacttggtca atccggtgga ggtcttgctg agccggagg atcactcaga 120
 ctgtcgtgcg ccgcctctgg gttcactttc tcctcactc cgatgaactg ggtgcccag 180
 gcgcccggga agggcctgga atgggtgtca tacatctcct cctcatcctc caccatctac 240

	tacgccgatt	ccgtgaaggg	ccgcttcaact	atttcccggg	acaacgcgaa	aaactcgctc	300
	tatctgcaaa	tgaactccct	gcgcgccgag	gacaccgccg	tgtactactg	cgcccgggac	360
	ctgagcgtgc	gggctattga	tgcgttcgac	atctggggac	agggcaccat	ggtcacagtg	420
	tccagcggag	gcggcggcag	cggtggagga	ggatcagggg	gaggagggtt	ggggggcggt	480
5	ggctccgata	tcgtgctgac	ccagagcccg	tcgagcctct	ccgcctccgt	cggcgacaga	540
	gtgaccatca	cgtgtcaggc	atcccaggac	attagcaact	acctgaattg	gtaccagcag	600
	aagcctggaa	aggcacccaa	gttgctgata	tacgacgcct	ccaacctgga	aaccggagtg	660
	ccatccaggt	tctcgggcag	cggtcgggga	accgacttca	cttttactat	ctcctccctg	720
	caacccgagg	atttcgcgac	ctactactgc	cagcaggcct	acagcacccc	tttcaccttc	780
10	gggcccggaa	ctaaggtcga	aatcaagacc	actaccccag	caccgaggcc	acccaccccg	840
	gctcctacca	tcgcctccca	gcctctgtcc	ctgcgtccgg	aggcatgtag	acccgcagct	900
	gggtggggccg	tgcatacccg	gggtcttgac	ttcgctcgcg	atatctacat	ttggggccct	960
	ctggctggta	cttgcggggt	cctgctgctt	tcactcgtga	tcactcttta	ctgtaagcgc	1020
	ggtcggaaga	agctgctgta	catctttaag	caacccttca	tgaggcctgt	gcagactact	1080
15	caagaggagg	acggctgttc	atgccggttc	ccagaggagg	aggaaggcgg	ctgcgaactg	1140
	cgcgtgaaat	tcagccgcag	cgcagatgct	ccagcctaca	agcaggggca	gaaccagctc	1200
	tacaacgaac	tcaatcttgg	tcggagagag	gagtacgacg	tgctggacaa	gcggagagga	1260
	cgggacccag	aaatgggcgg	gaagccgcgc	agaaagaatc	ccaagaggg	cctgtacaac	1320
	gagctccaaa	aggataagat	ggcagaagcc	tatagcgaga	ttggtatgaa	aggggaacgc	1380
20	agaagaggca	aaggccacga	cggactgtac	cagggactca	gcaccgccac	caaggacacc	1440
	tatgacgctc	ttcacatgca	ggccctgccg	cctcgg			1476
	<210>	114					
	<211>	1470					
	<212>	ДНК					
25	<213>	Искусственная последовательность					
	<220>						
	<221>	источник					
	<223>	/примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид"					
30	<400>	114					
	atggccctcc	ctgtcaccgc	cctgctgctt	ccgctggctc	ttctgctcca	cgccgctcgg	60
	cccgaagtgc	aattggtgca	atcaggagga	ggagtgggtca	gatctggaag	aagcctgaga	120
	ctgtcatgcg	cggcttcggg	ctttaccttc	aactcctacg	gcctccactg	ggtgcgccag	180
	gcccccgga	aaggcctcga	atgggtcgca	ctgattgagt	acgacgggtc	caacaagtac	240
35	tacggagata	gcgtgaaggg	ccgcttcacc	atctcacggg	acaagtccaa	gtccaccctg	300
	tatctgcaaa	tggacaacct	gagggccgag	gatactgccg	tgtactactg	cgcccgcgaa	360
	ggaaacgaag	atctggcctt	cgatatattg	ggccagggtg	ctcttgtagc	cgtgtcgagc	420
	ggaggcggag	gctccggtgg	aggaggatcg	gggggtgggt	gttccggcgg	cggggggagc	480
	gaaatcgtag	tgacccagtc	gccttcctcc	ctctccgctt	ccgtggggga	ccgggtcact	540
40	attacgtgtc	aggcgtccca	attcatcaag	aagaatctga	actggtacca	gcacaagccg	600
	ggaaaggccc	ccaaactgct	catctacgac	gccagctcgc	tgcagactgg	cgtgccttcc	660
	cggttttccg	ggaaccggtc	gggaaccacc	ttctcattca	ccatcagcag	cctccagccg	720
	gaggacgtgg	cgacctacta	ctgccagcag	catgacaacc	ttccactgac	tttcggcggg	780
	ggcaccaagg	tcgagattaa	gaccactacc	ccagcaccga	ggccaccac	ccgggtcct	840
45	accatcgctt	cccagcctct	gtccctgcgt	ccggaggcat	gtagaccgc	agctgggtgg	900
	gccgtgcata	cccgggggtct	tgacttcgcc	tgcgatatct	acatttgggc	ccctctggct	960
	ggtacttgcg	gggtcctgct	gctttcactc	gtgatcactc	tttactgtaa	gcgcggtcgg	1020
	aagaagctgc	tgtacatctt	taagcaaccc	ttcatgaggc	ctgtgcagac	tactcaagag	1080

	gaggacggct gttcatgccg gttcccagag gaggaggaag gcggtctgca actgcgcgctg	1140
	aaattcagcc gcagcgcaga tgctccagcc tacaagcagg ggagaacca gctctacaac	1200
	gaactcaatc ttggtcggag agaggagtac gacgtgctgg acaagcggag aggacgggac	1260
	ccagaaatgg gcggggaagcc ggcagaaaag aatccccaag agggcctgta caacgagctc	1320
5	caaaaggata agatggcaga agcctatagc gagattggta tgaaggggga acgcagaaga	1380
	ggcaaaggcc acgacggact gtaccaggga ctcagcaccg ccaccaagga cacctatgac	1440
	gctcttcaca tgcaggccct gccgcctcgg	1470
	<210> 115	
	<211> 1497	
10	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический	
15	полинуклеотид"	
	<400> 115	
	atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg	60
	ccccaagtgc aactcgtgga atcaggcgga ggactcgtgc aacccgaggg ttcccttaga	120
	ctgtcatgtg ccgcttccgg gttcaatgtg tccagcaact acatgacctg ggtagacag	180
20	gcgcccggaa agggacttga atgggtgtcc gtgatctact ccggtggagc aacatactac	240
	ggagactccg tgaaggccg ctttaccgtg tcccgcgata actcgaagaa caccgtgtac	300
	ttgcagatga acaggctgac tgccgaggac accgccgtgt attattgctc ccgggacagg	360
	ctgtactgtg gaaacaactg ctacctgtac tactactacg ggatggacgt gtggggacag	420
	ggcactctcg tcaactgtgtc atccgggggg ggcggtagcg gtggcgaggg gtccggcgga	480
25	ggaggctcag ggggaggcg aagcgatatc caggtcaccc agtctccctc ctgctgtcc	540
	gcctccgtgg gcgaccgcgt caccattact tgccgggcgt cgagtcgat cagctcctac	600
	ctgaactggt accagcagaa gcctggaaag gcccgaagc tgctgatcta cgcgccctcg	660
	tccctgcaaa gcggcgctccc gtcgcggttc agcggttccg gttcgggaac cgacttcacc	720
	ctgactattt cctccctgca acccgaggat ttcgccactt actactgcca gcagtcctac	780
30	tccacccac ctctgacctt cggccaagga accaaggctc aaatcaagac cactacccca	840
	gcaccgaggc caccaccccc ggctcctacc atcgctctcc agcctctgtc cctgctccg	900
	gaggcatgta gaccgcgagc tgggtggggcc gtgcataccc ggggtcttga cttcgctgc	960
	gatatctaca tttgggcccc tctggctggt acttgcgggg tctgctgct ttactcgtg	1020
	atcactcttt actgtaagcg cggtcggaag aagctgctgt acatctttaa gcaacccttc	1080
35	atgaggcctg tgcagactac tcaagaggag gacggctgtt catgccggtt ccagaggag	1140
	gaggaaggcg gctgcgaact gcgcgtgaaa ttcagccgca gcgcagatgc tccagcctac	1200
	aagcaggggc agaaccagct ctacaacgaa ctcaatcttg gtcggagaga ggagtacgac	1260
	gtgctggaca agcggagagg acgggacca gaaatgggcg ggaagccgcg cagaaagaat	1320
	ccccaagagg gcctgtacaa cgagctccaa aaggataaga tggcagaagc ctatagcgag	1380
40	attggtatga aaggggaacg cagaagaggc aaaggccacg acggactgta ccagggactc	1440
	agcaccgcca ccaaggacac ctatgacgct cttcacatgc aggccctgcc gcctcgg	1497
	<210> 116	
	<211> 1473	
	<212> ДНК	
45	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический	

полинуклеотид"

<400> 116

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg 60
 ccccaagtgc aactcgtcca gtccggtgca gaagtgaaaa agagcggagc ctcagtgaaa 120
 5 gtgtcctgca aggcctccgg ttacccttcc actggatact acattcagtg ggtccgcca 180
 gccccgggac aggggtctgga gtggatgggg tggattgacc ctaactcggg aaatacggga 240
 tacgcgcaga agttccaggg ccgcgtgacc atgaccagga acacctcgat cagcaccgcc 300
 tacatggaac tgtcctccct gcggtcggag gatactgccg tgtactactg cgcctccgat 360
 tcctatgggt actactacgg aatggacgtc tggggacagg gcaccctcgt gaccgtgtcc 420
 10 tcgggaggcg gagggagcgg cgggggtgga tcgggaggag gcgggtccgg cggcgggcgt 480
 agcgacatcc agatgaccca gtcaccatca agccttagcg cctccgtggg cgacagagt 540
 acattcactt gtcgggctgc ccagggaatc tcctccgctc tggcttggtg tcagcagaag 600
 cctgggaagc ctccgaagct gttgatctac gacgcgagca gcctggaatc aggggtgccc 660
 tcccggtttt ccgggtccgg ttctggcacc gatttcaccc tgaccatttc gtccctccaa 720
 15 cccgaggact tcgccactta ctactgccag cagttaaca actaccgct gaccttcgga 780
 ggaggcacta aggtcgagat caagaccact accccagcac cgaggccacc caccgccgt 840
 cctaccatcg cctcccagcc tctgtccctg cgtccggagg catgtagacc cgcagctggt 900
 ggggccgtgc ataccggggg tcttgacttc gcctgcgata tctacatttg ggcccctctg 960
 gctggtactt gcggggtcct gctgctttca ctcgtgatca ctctttactg taagcgcggt 1020
 20 cggaagaagc tgctgtacat ctttaagcaa cccttcatga ggcctgtgca gactactcaa 1080
 gaggaggacg gctgttcatg ccggttccca gaggaggagg aaggcggctg cgaactgcgc 1140
 gtgaaattca gccgcagcgc agatgctcca gcctacaagc aggggcagaa ccagctctac 1200
 aacgaactca atcttggtcg gagagaggag tacgacgtgc tggacaagcg gagaggacgg 1260
 gaccacagaaa tgggcgggaa gccgcgcaga aagaatcccc aagagggcct gtacaacgag 1320
 25 ctccaaaagg ataagatggc agaagcctat agcgagattg gtatgaaagg ggaacgcaga 1380
 agaggcaaaag gccacgacgg actgtaccag ggactcagca ccgccacca ggacacctat 1440
 gacgctcttc acatgcaggc cctgccgcct cgg 1473

<210> 117

<211> 10

30 <212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

35 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"

<400> 117

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser

1

5

10

<210> 118

40 <211> 10

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

45 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"

<400> 118

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Met His

1 5 10
 <210> 119
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 10 <400> 119
 Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly
 1 5 10
 <210> 120
 <211> 10
 15 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 20 пептид"
 <400> 120
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met Ser
 1 5 10
 <210> 121
 25 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 30 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 121
 Gly Gly Pro Val Arg Ser Gly Ser His Tyr Trp Asn
 1 5 10
 35 <210> 122
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 40 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 122
 Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser
 45 1 5 10
 <210> 123
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 5 пептид"
 <400> 123
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met Asn
 1 5 10
 <210> 124
 10 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 15 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 124
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Glu Met Asn
 1 5 10
 20 <210> 125
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 25 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 125
 Ala Asn Thr Phe Ser Asp His Val Met His
 30 1 5 10
 <210> 126
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 35 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 126
 40 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met Asn
 1 5 10
 <210> 127
 <211> 10
 <212> PRT
 45 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический

пептид"

<400> 127
 Gly Phe Thr Phe Asn Ser Tyr Gly Leu His
 1 5 10

5 <210> 128
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"

<400> 128
 Gly Phe Asn Val Ser Ser Asn Tyr Met Thr
 1 5 10

15 <210> 129
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"

20 <400> 129
 Gly Tyr Pro Phe Thr Gly Tyr Tyr Ile Gln
 1 5 10

25 <210> 130
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"

30 <400> 130
 Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

35 <210> 131
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"

40 <400> 131
 Leu Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

45

Gly
 <210> 132
 <211> 16
 <212> PRT
 5 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"

10 <400> 132
 Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 <210> 133
 <211> 17
 15 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"

20 <400> 133
 Asn Ile Asn Glu Asp Gly Ser Ala Lys Phe Tyr Val Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 25 <210> 134
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 30 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"

<400> 134
 Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Glu Asn
 35 1 5 10 15
 <210> 135
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 40 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"

<400> 135
 45 Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 <210> 136
 <211> 17

<212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 5 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 136
 Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 10 Gly
 <210> 137
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 15 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 137
 20 Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 138
 <211> 17
 25 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 30 пептид"
 <400> 138
 Tyr Ile His Ala Ala Asn Gly Gly Thr His Tyr Ser Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 Asp
 35 <210> 139
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 40 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 139
 Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 45 1 5 10 15
 Gly
 <210> 140
 <211> 17

<212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 5 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 140
 Leu Ile Glu Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 10 Gly
 <210> 141
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 15 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 141
 20 Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15
 <210> 142
 <211> 17
 <212> PRT
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 30 <400> 142
 Trp Ile Asp Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 143
 35 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 40 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 143
 Asp Leu Glu Met Ala Thr Ile Met Gly Gly Tyr
 1 5 10
 45 <210> 144
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 5 <400> 144
 Val Phe Asp Ser Tyr Tyr Met Asp Val
 1 5
 <210> 145
 <211> 15
 10 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 15 <400> 145
 Pro Gly Thr Tyr Tyr Asp Phe Leu Ser Gly Tyr Tyr Pro Phe Tyr
 1 5 10 15
 <210> 146
 20 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 25 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 <400> 146
 Asp Leu Arg Ser Gly Arg Tyr
 1 5
 30 <210> 147
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 35 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственная последовательность: синтетический пептид"
 <400> 147
 Gly Thr Ala Thr Phe Asp Trp Asn Phe Pro Phe Asp Ser
 40 1 5 10
 <210> 148
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 45 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"

<400> 148
 Gly Ser Gly Leu Val Val Tyr Ala Ile Arg Val Gly Ser Gly Trp Phe
 1 5 10 15
 Asp Tyr
 5 <210> 149
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 10 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 149
 Asp Pro Ser Ser Ser Gly Ser Tyr Tyr Met Glu Asp Ser Tyr Tyr Tyr
 15 1 5 10 15
 Gly Met Asp Val
 20
 <210> 150
 <211> 8
 20 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 25 пептид"
 <400> 150
 Glu Ala Leu Gly Ser Ser Trp Glu
 1 5
 <210> 151
 30 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 35 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 151
 Gly Gly Tyr Asn Ser Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5 10
 40 <210> 152
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 45 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 152

Asp Leu Ser Val Arg Ala Ile Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10
<210> 153
<211> 10
5 <212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
10 пептид"
<400> 153
Glu Gly Asn Glu Asp Leu Ala Phe Asp Ile
1 5 10
<210> 154
15 <211> 19
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник
20 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
пептид"
<400> 154
Asp Arg Leu Tyr Cys Gly Asn Asn Cys Tyr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
1 5 10 15
25 Met Asp Val
<210> 155
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
30 <220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
пептид"
<400> 155
35 Asp Ser Tyr Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10
<210> 156
<211> 14
<212> PRT
40 <213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
пептид"
45 <400> 156
Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
1 5 10
<210> 157

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 5 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 <400> 157
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
 10 1 5 10 15
 <210> 158
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 15 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 <400> 158
 20 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10
 <210> 159
 <211> 12
 <212> PRT
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 30 <400> 159
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ser Phe Leu Ala
 1 5 10
 <210> 160
 <211> 11
 35 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 40 <400> 160
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
 1 5 10
 <210> 161
 45 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 <400> 161
 5 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
 1 5 10
 <210> 162
 <211> 13
 <212> PRT
 10 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 15 <400> 162
 Thr Gly Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn Tyr Val Gln
 1 5 10
 <210> 163
 <211> 11
 20 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 25 <400> 163
 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
 1 5 10
 <210> 164
 30 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 35 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 <400> 164
 Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 1 5 10
 40 <210> 165
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 45 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 <400> 165

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10
<210> 166
<211> 11
5 <212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
10 пептид"
<400> 166
Gln Ala Ser Gln Phe Ile Lys Lys Asn Leu Asn
1 5 10
<210> 167
15 <211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник
20 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
пептид"
<400> 167
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10
25 <210> 168
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
30 <221> источник
<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
пептид"
<400> 168
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
35 1 5 10
<210> 169
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
40 <220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
пептид"
<400> 169
45 Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser
1 5
<210> 170
<211> 7

<212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 5 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 170
 Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser
 1 5
 10 <210> 171
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 15 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 171
 Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
 20 1 5
 <210> 172
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 25 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 172
 30 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5
 <210> 173
 <211> 7
 <212> PRT
 35 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 40 <400> 173
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5
 <210> 174
 <211> 7
 45 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 174
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 5 1 5
 <210> 175
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 10 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 175
 15 Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 176
 <211> 7
 <212> PRT
 20 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 25 <400> 176
 Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr
 1 5
 <210> 177
 <211> 7
 30 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 35 пептид"
 <400> 177
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5
 <210> 178
 40 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 45 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 178
 Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr

1 5
 <210> 179
 <211> 7
 <212> PRT
 5 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 10 <400> 179
 Asp Ala Ser Ser Leu Gln Thr
 1 5
 <210> 180
 <211> 7
 15 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 20 пептид"
 <400> 180
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5
 <210> 181
 25 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 30 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 181
 Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
 1 5
 35 <210> 182
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 40 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 182
 Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Leu Asp Val Val
 45 1 5 10
 <210> 183
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 5 пептид"
 <400> 183
 Met Gln Gly Thr His Trp Ser Phe Thr
 1 5
 <210> 184
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 15 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 184
 Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5
 20 <210> 185
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 25 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 185
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Pro Thr
 30 1 5
 <210> 186
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 35 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 186
 40 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 187
 <211> 10
 <212> PRT
 45 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический

пептид"

<400> 187

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Trp Thr

1 5 10

5 <210> 188

<211> 10

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

10 <221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"

<400> 188

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Asn Gln Val Val

15 1 5 10

<210> 189

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

20 <220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"

<400> 189

25 Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Leu Thr

1 5

<210> 190

<211> 9

<212> PRT

30 <213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"

35 <400> 190

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 191

<211> 9

40 <212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"

45 <400> 191

Gln Gln Ala Tyr Ser Thr Pro Phe Thr

1 5

<210> 192
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 5 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 192
 10 Gln Gln His Asp Asn Leu Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 193
 <211> 10
 <212> PRT
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственная последовательность: синтетический
 пептид"
 20 <400> 193
 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Leu Thr
 1 5 10
 <210> 194
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственная последовательность: синтетический
 30 пептид"
 <400> 194
 Gln Gln Phe Asn Asn Tyr Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 195
 35 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 40 <223> /примечание="Описание Искусственная последовательность: синтетический
 полипептид"
 <400> 195
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 45 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
5 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Pro Tyr Ser Ser Ser Trp His Asp Ala Phe Asp Ile Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
10 115 120
<210> 196
<211> 108
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
15 <220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание Искусственная последовательность: синтетический
полипептид"
<400> 196
20 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
25 35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
30 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105
<210> 197
35 <211> 489
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник
40 <223> /примечание="Описание Искусственная последовательность: синтетический
полипептид"
<400> 197
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
45 His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30
Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45

RU 2741 120 C2

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

Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
 435 440 445
 Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
 450 455 460
 5 Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
 465 470 475 480
 Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485

<210> 198

10 <211> 1467

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

15 <223> /примечание="Описание Искусственная последовательность: синтетический полинуклеотид"

<400> 198

	atggccctcc	ctgtcaccgc	cctgctgctt	ccgctggctc	ttctgctcca	cgccgctcgg	60
	cccgaagtgc	aactcgtgga	aagcgggtgga	ggtcttgctc	aacctggagg	ttccttgctc	120
20	ctgtcatgtg	cagcttccgg	cttcactttc	tcctcgtacg	agatgaattg	ggtgcggcag	180
	gcgcctggaa	aggggctgga	atgggtgtcc	tacatctcaa	gctccggctc	gaccatctac	240
	tacgcggaca	gcgtgaagg	gcggttcacg	atttcgagg	acaacgcaa	gaactcgtc	300
	tatctgcaaa	tgaactccct	gagagccgag	gacaccgctg	tgtattactg	cgcccgggac	360
	ccctactcct	cctcatggca	cgacgccttt	gatatctggg	gccagggaac	catggtcacc	420
25	gtcagcagcg	ggggcgagg	ttccggggga	gggggctccg	gcggaggagg	ctccgagatt	480
	gtgttgactc	agagcccggg	taccctgtcg	ctgagccccg	gagagcgggc	caccctttca	540
	tgccgcgcca	gccagtccgt	gtcctcatcc	tacctcgcgt	ggtaccagca	gaaacctggc	600
	caggccccgc	ggctgctgat	ctacggcgcc	tcctcgcgcg	caaccggaat	ccccgaccgg	660
	ttctccgggt	ctggcagcgg	aaccgacttc	actctcacca	tttcgagggt	ggagccggaa	720
30	gatttcgccc	tgtactactg	ccagcagtac	ggctcctcgc	cactgacttt	cggcggagga	780
	accaaggtcg	atatcaagac	cactacccca	gcaccgaggc	caccacccc	ggctcctacc	840
	atgcctccc	agcctctgtc	cctgcgtccg	gaggcatgta	gacccgcagc	tggtggggcc	900
	gtgcataccc	ggggtcttga	cttcgcctgc	gatatctaca	tttgggcccc	tctggctggt	960
	acttgccggg	tcctgctgct	ttcactcgtg	atcactcttt	actgtaagcg	cggtcggaag	1020
35	aagctgctgt	acatctttta	gcaacccttc	atgaggcctg	tgcagactac	tcaagaggag	1080
	gacggctggt	catgccgggt	cccagaggag	gaggaaggcg	gctgcgaact	gcgcgtgaaa	1140
	ttcagccgca	gcgcagatgc	tccagcctac	aagcaggggc	agaaccagct	ctacaacgaa	1200
	ctcaatcttg	gtcggagaga	ggagtacgac	gtgctggaca	agcggagagg	acgggaccca	1260
	gaaatgggcg	ggaagccgcg	cagaaaagaat	ccccaaagagg	gcctgtacaa	cgagctccaa	1320
40	aaggataaga	tggcagaagc	ctatagcgag	attggtatga	aaggggaacg	cagaagaggc	1380
	aaaggccacg	acggactgta	ccagggactc	agcaccgcca	ccaaggacac	ctatgacgct	1440
	cttcacatgc	aggccctgcc	gcctcgg				1467

<210> 199

<211> 10

45 <212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 199
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Glu Met Asn
 5 1 5 10
 <210> 200
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 10 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 200
 15 Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 201
 <211> 13
 20 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 25 пептид"
 <400> 201
 Asp Pro Tyr Ser Ser Ser Trp His Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5 10
 <210> 202
 30 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 35 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 202
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10
 40 <210> 203
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 45 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 203

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5
 <210> 204
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 10 пептид"
 <400> 204
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 205
 15 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 20 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 полипептид"
 <400> 205
 Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Gly Gly Pro Ser Ser Pro Lys Lys
 1 5 10 15
 25 Lys Arg Lys Val Ser Arg Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly
 20 25 30
 Asp Gly Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr
 35 40 45
 Thr Gly Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg
 30 50 55 60
 Asn Lys Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly
 65 70 75 80
 Trp Glu Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu
 85 90 95
 35 Thr Ile Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile
 100 105 110
 Ile Pro Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu
 115 120 125
 Glu Thr Ser Tyr
 40 130
 <210> 206
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 45 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 полипептид"

<400> 206

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

<210> 207

<211> 93

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

20 <220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полипептид"

<400> 207

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

<210> 208

<211> 95

<212> PRT

40 <213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полипептид"

45 <400> 208

Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Ile Glu Ala Ser Arg
 1 5 10 15
 Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu

20 25 30
 Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr
 35 40 45
 Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp
 5 50 55 60
 Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Thr Gln Ala
 65 70 75 80
 Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Thr Ser
 85 90 95
 10 <210> 209
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 15 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 полипептид"
 <400> 209
 Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Leu Glu Ala Ser Arg
 20 1 5 10 15
 Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu
 20 25 30
 Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr
 35 40 45
 25 Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp
 50 55 60
 Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Thr Gln Ala
 65 70 75 80
 Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Thr Ser
 30 85 90 95
 <210> 210
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 35 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 полипептид"
 <400> 210
 40 Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Glu Glu Ala Ser Arg
 1 5 10 15
 Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu
 20 25 30
 Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr
 35 40 45
 45 Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp
 50 55 60
 Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Leu Gln Ala

	65					70					75					80
	Trp	Asp	Leu	Tyr	Tyr	His	Val	Phe	Arg	Arg	Ile	Ser	Lys	Thr	Ser	
					85					90					95	
	<210>	211														
5	<211>	95														
	<212>	PRT														
	<213>	Искусственная последовательность														
	<220>															
	<221>	источник														
10	<223>	/примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полипептид"														
	<220>															
	<221>	MOD_RES														
	<222>	(12)..(12)														
15	<223>	Любая аминокислота														
	<220>															
	<221>	MOD_RES														
	<222>	(78)..(78)														
	<223>	Любая амнокислота														
20	<400>	211														
	Ile	Leu	Trp	His	Glu	Met	Trp	His	Glu	Gly	Leu	Xaa	Glu	Ala	Ser	Arg
	1				5					10					15	
	Leu	Tyr	Phe	Gly	Glu	Arg	Asn	Val	Lys	Gly	Met	Phe	Glu	Val	Leu	Glu
				20				25					30			
25	Pro	Leu	His	Ala	Met	Met	Glu	Arg	Gly	Pro	Gln	Thr	Leu	Lys	Glu	Thr
			35					40					45			
	Ser	Phe	Asn	Gln	Ala	Tyr	Gly	Arg	Asp	Leu	Met	Glu	Ala	Gln	Glu	Trp
		50					55					60				
	Cys	Arg	Lys	Tyr	Met	Lys	Ser	Gly	Asn	Val	Lys	Asp	Leu	Xaa	Gln	Ala
30	65					70					75					80
	Trp	Asp	Leu	Tyr	Tyr	His	Val	Phe	Arg	Arg	Ile	Ser	Lys	Thr	Ser	
					85					90					95	
	<210>	212														
	<211>	95														
35	<212>	PRT														
	<213>	Искусственная последовательность														
	<220>															
	<221>	источник														
	<223>	/примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полипептид"														
40	<400>	212														
	Ile	Leu	Trp	His	Glu	Met	Trp	His	Glu	Gly	Leu	Ile	Glu	Ala	Ser	Arg
	1				5					10					15	
	Leu	Tyr	Phe	Gly	Glu	Arg	Asn	Val	Lys	Gly	Met	Phe	Glu	Val	Leu	Glu
				20					25				30			
45	Pro	Leu	His	Ala	Met	Met	Glu	Arg	Gly	Pro	Gln	Thr	Leu	Lys	Glu	Thr
			35					40					45			
	Ser	Phe	Asn	Gln	Ala	Tyr	Gly	Arg	Asp	Leu	Met	Glu	Ala	Gln	Glu	Trp

50 55 60
Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Leu Gln Ala
65 70 75 80
Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Thr Ser
5 85 90 95
<210> 213
<211> 95
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
10 <220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
полипептид"
<400> 213
15 Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Leu Glu Ala Ser Arg
1 5 10 15
Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu
20 25 30
Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr
20 35 40 45
Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp
50 55 60
Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Leu Gln Ala
65 70 75 80
25 Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Thr Ser
85 90 95
<210> 214
<211> 1132
<212> PRT
30 <213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
полипептид"
35 <400> 214
Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser
1 5 10 15
His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly
20 25 30
40 Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg
35 40 45
Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro
50 55 60
Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu
45 65 70 75 80
Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val
85 90 95
Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro Pro

RU 2741 120 C2

		100		105		110											
		Glu	Ala	Phe	Thr	Thr	Ser	Val	Arg	Ser	Tyr	Leu	Pro	Asn	Thr	Val	Thr
		115							120					125			
5		Asp	Ala	Leu	Arg	Gly	Ser	Gly	Ala	Trp	Gly	Leu	Leu	Leu	Arg	Arg	Val
		130						135					140				
		Gly	Asp	Asp	Val	Leu	Val	His	Leu	Leu	Ala	Arg	Cys	Ala	Leu	Phe	Val
		145					150				155					160	
		Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Cys	Ala	Tyr	Gln	Val	Cys	Gly	Pro	Pro	Leu	Tyr
					165					170						175	
10		Gln	Leu	Gly	Ala	Ala	Thr	Gln	Ala	Arg	Pro	Pro	Pro	His	Ala	Ser	Gly
					180					185					190		
		Pro	Arg	Arg	Arg	Leu	Gly	Cys	Glu	Arg	Ala	Trp	Asn	His	Ser	Val	Arg
					195				200					205			
15		Glu	Ala	Gly	Val	Pro	Leu	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Gly	Ala	Arg	Arg	Arg
		210						215					220				
		Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Arg	Ser	Leu	Pro	Leu	Pro	Lys	Arg	Pro	Arg	Arg
		225					230				235					240	
		Gly	Ala	Ala	Pro	Glu	Pro	Glu	Arg	Thr	Pro	Val	Gly	Gln	Gly	Ser	Trp
					245					250						255	
20		Ala	His	Pro	Gly	Arg	Thr	Arg	Gly	Pro	Ser	Asp	Arg	Gly	Phe	Cys	Val
					260					265					270		
		Val	Ser	Pro	Ala	Arg	Pro	Ala	Glu	Glu	Ala	Thr	Ser	Leu	Glu	Gly	Ala
					275				280					285			
		Leu	Ser	Gly	Thr	Arg	His	Ser	His	Pro	Ser	Val	Gly	Arg	Gln	His	His
25		290					295						300				
		Ala	Gly	Pro	Pro	Ser	Thr	Ser	Arg	Pro	Pro	Arg	Pro	Trp	Asp	Thr	Pro
		305					310				315					320	
		Cys	Pro	Pro	Val	Tyr	Ala	Glu	Thr	Lys	His	Phe	Leu	Tyr	Ser	Ser	Gly
					325					330						335	
30		Asp	Lys	Glu	Gln	Leu	Arg	Pro	Ser	Phe	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Pro
					340					345					350		
		Ser	Leu	Thr	Gly	Ala	Arg	Arg	Leu	Val	Glu	Thr	Ile	Phe	Leu	Gly	Ser
					355				360					365			
		Arg	Pro	Trp	Met	Pro	Gly	Thr	Pro	Arg	Arg	Leu	Pro	Arg	Leu	Pro	Gln
35		370					375						380				
		Arg	Tyr	Trp	Gln	Met	Arg	Pro	Leu	Phe	Leu	Glu	Leu	Leu	Gly	Asn	His
		385					390				395					400	
		Ala	Gln	Cys	Pro	Tyr	Gly	Val	Leu	Leu	Lys	Thr	His	Cys	Pro	Leu	Arg
					405					410						415	
40		Ala	Ala	Val	Thr	Pro	Ala	Ala	Gly	Val	Cys	Ala	Arg	Glu	Lys	Pro	Gln
					420					425					430		
		Gly	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Glu	Glu	Glu	Asp	Thr	Asp	Pro	Arg	Arg	Leu
					435				440					445			
		Val	Gln	Leu	Leu	Arg	Gln	His	Ser	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Tyr	Gly	Phe
45		450					455						460				
		Val	Arg	Ala	Cys	Leu	Arg	Arg	Leu	Val	Pro	Pro	Gly	Leu	Trp	Gly	Ser
		465					470				475					480	
		Arg	His	Asn	Glu	Arg	Arg	Phe	Leu	Arg	Asn	Thr	Lys	Lys	Phe	Ile	Ser

RU 2741 120 C2

				485					490					495			
	Leu	Gly	Lys	His	Ala	Lys	Leu	Ser	Leu	Gln	Glu	Leu	Thr	Trp	Lys	Met	
				500					505					510			
	Ser	Val	Arg	Gly	Cys	Ala	Trp	Leu	Arg	Arg	Ser	Pro	Gly	Val	Gly	Cys	
5				515				520					525				
	Val	Pro	Ala	Ala	Glu	His	Arg	Leu	Arg	Glu	Glu	Ile	Leu	Ala	Lys	Phe	
				530				535					540				
	Leu	His	Trp	Leu	Met	Ser	Val	Tyr	Val	Val	Glu	Leu	Leu	Arg	Ser	Phe	
	545					550					555					560	
10	Phe	Tyr	Val	Thr	Glu	Thr	Thr	Phe	Gln	Lys	Asn	Arg	Leu	Phe	Phe	Tyr	
				565					570					575			
	Arg	Lys	Ser	Val	Trp	Ser	Lys	Leu	Gln	Ser	Ile	Gly	Ile	Arg	Gln	His	
				580					585					590			
	Leu	Lys	Arg	Val	Gln	Leu	Arg	Glu	Leu	Ser	Glu	Ala	Glu	Val	Arg	Gln	
15				595				600					605				
	His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu	Arg	Phe	Ile	
				610				615					620				
	Pro	Lys	Pro	Asp	Gly	Leu	Arg	Pro	Ile	Val	Asn	Met	Asp	Tyr	Val	Val	
	625					630					635					640	
20	Gly	Ala	Arg	Thr	Phe	Arg	Arg	Glu	Lys	Arg	Ala	Glu	Arg	Leu	Thr	Ser	
				645							650				655		
	Arg	Val	Lys	Ala	Leu	Phe	Ser	Val	Leu	Asn	Tyr	Glu	Arg	Ala	Arg	Arg	
				660					665					670			
	Pro	Gly	Leu	Leu	Gly	Ala	Ser	Val	Leu	Gly	Leu	Asp	Asp	Ile	His	Arg	
25				675				680						685			
	Ala	Trp	Arg	Thr	Phe	Val	Leu	Arg	Val	Arg	Ala	Gln	Asp	Pro	Pro	Pro	
				690				695					700				
	Glu	Leu	Tyr	Phe	Val	Lys	Val	Asp	Val	Thr	Gly	Ala	Tyr	Asp	Thr	Ile	
	705					710					715					720	
30	Pro	Gln	Asp	Arg	Leu	Thr	Glu	Val	Ile	Ala	Ser	Ile	Ile	Lys	Pro	Gln	
				725							730				735		
	Asn	Thr	Tyr	Cys	Val	Arg	Arg	Tyr	Ala	Val	Val	Gln	Lys	Ala	Ala	His	
				740					745					750			
	Gly	His	Val	Arg	Lys	Ala	Phe	Lys	Ser	His	Val	Ser	Thr	Leu	Thr	Asp	
35				755				760						765			
	Leu	Gln	Pro	Tyr	Met	Arg	Gln	Phe	Val	Ala	His	Leu	Gln	Glu	Thr	Ser	
				770				775					780				
	Pro	Leu	Arg	Asp	Ala	Val	Val	Ile	Glu	Gln	Ser	Ser	Ser	Leu	Asn	Glu	
	785					790					795					800	
40	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Phe	Asp	Val	Phe	Leu	Arg	Phe	Met	Cys	His	His	
				805						810					815		
	Ala	Val	Arg	Ile	Arg	Gly	Lys	Ser	Tyr	Val	Gln	Cys	Gln	Gly	Ile	Pro	
				820						825				830			
	Gln	Gly	Ser	Ile	Leu	Ser	Thr	Leu	Leu	Cys	Ser	Leu	Cys	Tyr	Gly	Asp	
45				835				840						845			
	Met	Glu	Asn	Lys	Leu	Phe	Ala	Gly	Ile	Arg	Arg	Asp	Gly	Leu	Leu	Leu	
				850				855					860				
	Arg	Leu	Val	Asp	Asp	Phe	Leu	Leu	Val	Thr	Pro	His	Leu	Thr	His	Ala	

	865		870		875		880									
	Lys	Thr	Phe	Leu	Arg	Thr	Leu	Val	Arg	Gly	Val	Pro	Glu	Tyr	Gly	Cys
				885				890							895	
	Val	Val	Asn	Leu	Arg	Lys	Thr	Val	Val	Asn	Phe	Pro	Val	Glu	Asp	Glu
5			900					905						910		
	Ala	Leu	Gly	Gly	Thr	Ala	Phe	Val	Gln	Met	Pro	Ala	His	Gly	Leu	Phe
			915					920						925		
	Pro	Trp	Cys	Gly	Leu	Leu	Leu	Asp	Thr	Arg	Thr	Leu	Glu	Val	Gln	Ser
			930					935						940		
10	Asp	Tyr	Ser	Ser	Tyr	Ala	Arg	Thr	Ser	Ile	Arg	Ala	Ser	Leu	Thr	Phe
			945				950				955				960	
	Asn	Arg	Gly	Phe	Lys	Ala	Gly	Arg	Asn	Met	Arg	Arg	Lys	Leu	Phe	Gly
				965					970						975	
	Val	Leu	Arg	Leu	Lys	Cys	His	Ser	Leu	Phe	Leu	Asp	Leu	Gln	Val	Asn
15			980						985					990		
	Ser	Leu	Gln	Thr	Val	Cys	Thr	Asn	Ile	Tyr	Lys	Ile	Leu	Leu	Leu	Gln
			995					1000						1005		
	Ala	Tyr	Arg	Phe	His	Ala	Cys	Val	Leu	Gln	Leu	Pro	Phe	His	Gln	
			1010					1015						1020		
20	Gln	Val	Trp	Lys	Asn	Pro	Thr	Phe	Phe	Leu	Arg	Val	Ile	Ser	Asp	
			1025					1030						1035		
	Thr	Ala	Ser	Leu	Cys	Tyr	Ser	Ile	Leu	Lys	Ala	Lys	Asn	Ala	Gly	
			1040					1045						1050		
	Met	Ser	Leu	Gly	Ala	Lys	Gly	Ala	Ala	Gly	Pro	Leu	Pro	Ser	Glu	
25			1055					1060						1065		
	Ala	Val	Gln	Trp	Leu	Cys	His	Gln	Ala	Phe	Leu	Leu	Lys	Leu	Thr	
			1070					1075						1080		
	Arg	His	Arg	Val	Thr	Tyr	Val	Pro	Leu	Leu	Gly	Ser	Leu	Arg	Thr	
			1085					1090						1095		
30	Ala	Gln	Thr	Gln	Leu	Ser	Arg	Lys	Leu	Pro	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	
			1100					1105						1110		
	Ala	Leu	Glu	Ala	Ala	Ala	Asn	Pro	Ala	Leu	Pro	Ser	Asp	Phe	Lys	
			1115					1120						1125		
	Thr	Ile	Leu	Asp												
35			1130													
	<210>	215														
	<211>	4027														
	<212>	ДНК														
	<213>	Искусственная последовательность														
40	<220>															
	<221>	источник														
	<223>	/примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид"														
	<400>	215														
45	caggcagcgt	ggtcctgctg	cgcacgtggg	aagccctggc	cccggccacc	cccgcgatgc										60
	cgcgcgctcc	ccgctgccga	gccgtgcgct	ccctgctgcg	cagccactac	cgcgaggtgc										120
	tgccgctggc	cacgttcgtg	cggcgccctg	ggccccagg	ctggcggtg	gtgcagcgcg										180
	gggacccggc	ggctttccgc	gcgctggtgg	cccagtgcc	ggtgtgcgtg	ccctgggacg										240

	cacggccgcc	ccccgccgcc	ccctccttcc	gccaggtgtc	ctgcctgaag	gagctggtgg	300
	cccagtgct	gcagaggctg	tgcgagcgcg	gcgcgaagaa	cgtgctggcc	ttcggcttcg	360
	cgtgctgga	cggggcccg	gggggcccc	ccgaggcctt	caccaccagc	gtgcgcagct	420
	acctgccc	cacggtgacc	gacgcactgc	gggggagcgg	ggcgtggggg	ctgctgttgc	480
5	gccgcgtggg	cgacgacgtg	ctggttcacc	tgctggcacg	ctgcgcgctc	tttgtgctgg	540
	tggctcccag	ctgcgcctac	caggtgtgcg	ggccgccgct	gtaccagctc	ggcgtgcc	600
	ctcaggcccc	gcccccgcca	cacgctagtg	gacccgaag	gcgtctggga	tgcgaacggg	660
	cctggaacca	tagcgtcagg	gaggccgggg	tccccctggg	cctgccagcc	ccgggtgcga	720
	ggaggcgcg	gggcagtgcc	agccgaagtc	tgccgttgcc	caagaggccc	aggcgtggcg	780
10	ctgccccctga	gccggagcgg	acgcccgttg	ggcaggggtc	ctgggcccac	ccgggcagga	840
	cgcgtggacc	gagtgaccgt	ggtttctgtg	tgggtgtcacc	tgccagacct	gccgaagaag	900
	ccacctcttt	ggagggtgcg	ctctctggca	cgcgccactc	ccacccatcc	gtgggcccgc	960
	agcaccacgc	gggcccccca	tccacatcgc	ggccaccacg	tccctgggac	acgccttgct	1020
	ccccggtgta	cgccgagacc	aagcacttcc	tctactcctc	aggcgacaag	gagcagctgc	1080
15	ggccccctctt	cctactcagc	tctctgaggc	ccagcctgac	tggcgctcgg	aggctcgtgg	1140
	agaccatctt	tctgggttcc	aggccctgga	tgccagggac	tccccgcagg	ttgccccgcc	1200
	tgccccagcg	ctactggcaa	atgcggcccc	tgtttctgga	gctgcttggg	aaccacgcgc	1260
	agtgccccta	cgggggtgctc	ctcaagacgc	actgcccgt	gcgagctgcg	gtcaccaccag	1320
	cagccggtgt	ctgtgccccg	gagaagcccc	agggctctgt	ggcggccccc	gaggaggagg	1380
20	acacagaccc	ccgtgcgctg	gtgcagctgc	tccgccagca	cagcagcccc	tggcaggtgt	1440
	acggcttcgt	gcgggcctgc	ctgcgccggc	tgggtgcccc	aggcctctgg	ggctccaggc	1500
	acaacgaacg	ccgcttcctc	aggaacacca	agaagtcat	ctccctgggg	aagcatgcca	1560
	agctctcgct	gcaggagctg	acgtggaaga	tgagcgtgcg	gggctgcgct	tggctgcga	1620
	ggagcccagg	ggttggtgctg	gttccggccg	cagagcaccg	tctgcgtgag	gagatccctgg	1680
25	ccaagtccct	gactggctg	atgagtggtg	acgtcgtcga	gctgctcagg	tctttctttt	1740
	atgtcacgga	gaccacgttt	caaaagaaca	ggctcttttt	ctaccggaag	agtgtctgga	1800
	gcaagttgca	aagcattgga	atcagacagc	acttgaagag	ggtgcagctg	cgggagctgt	1860
	cggaagcaga	ggtcaggcag	catcggaag	ccaggcccg	cctgctgacg	tccagactcc	1920
	gcttcatccc	caagcctgac	gggctgcggc	cgattgtgaa	catggactac	gtcgtgggag	1980
30	ccagaacgtt	ccgcagagaa	aagagggccg	agcgtctcac	ctcgaggggtg	aaggcactgt	2040
	tcagcgtgct	caactacgag	cgggcgcggc	gccccggcct	cctgggcgcc	tctgtgctgg	2100
	gcctggacga	tatccacagg	gcctggcgca	ccttcgtgct	gcgtgtgcgg	gcccaggacc	2160
	cgcgcgctga	gctgtacttt	gtcaaggtgg	atgtgacggg	cgcgtacgac	accatcccc	2220
	aggacaggct	cacggaggtc	atcgccagca	tcatcaaacc	ccagaacacg	tactgcgtgc	2280
35	gtcgggtatgc	cgtgggtccag	aaggccgccc	atgggcacgt	ccgcaaggcc	ttcaagagcc	2340
	acgtctctac	cttgacagac	ctccagccgt	acatgcgaca	gttcgtggct	cacctgcagg	2400
	agaccagccc	gctgagggat	gccgtcgtca	tcgagcagag	ctcctccctg	aatgaggcca	2460
	gcagtggcct	cttcgacgtc	ttcctacgct	tcatgtgcca	ccacgccgtg	cgcatcaggg	2520
	gcaagtccta	cgtccagtgc	caggggatcc	cgcagggtc	catcctctcc	acgtgctct	2580
40	gcagcctgtg	ctacggcgac	atggagaaca	agctgtttgc	ggggattcgg	cgggacgggc	2640
	tgtccctgcg	tttgggtgat	gatttcttgt	tgggtgacacc	tcacctcacc	cacgcgaaaa	2700
	ccttcctcag	gaccctggtc	cgaggtgtcc	ctgagtatgg	ctgcgtgggtg	aacttgcgga	2760
	agacagtgg	gaacttccct	gtagaagacg	aggccctggg	tggcacggct	tttgttcaga	2820
	tgcgggcccc	cggcctattc	ccctgggtg	gcctgctgct	ggatacccg	accctggagg	2880
45	tgcagagcga	ctactccagc	tatgcccgga	cctccatcag	agccagtctc	accttcaacc	2940
	gcggcttcaa	ggctgggagg	aacatgcgtc	gcaaactctt	tggggctctt	cggctgaagt	3000
	gtcacagcct	gtttctggat	ttgcagggtga	acagcctcca	gacgggtgtgc	accaacatct	3060
	acaagatcct	cctgctgcag	gcgtacaggt	ttcacgcagt	tgtgctgcag	ctcccatttc	3120

	atcagcaagt ttggaagaac cccacatfff tcctgcgcgf catctctgac acggcctccc	3180
	tctgctactc catcctgaaa gccaagaacg cagggatgfc gctggggggc aagggcgccg	3240
	ccggccctct gccctccgag gccgtgcagt ggctgtgcc acaagcattc ctgctcaagc	3300
	tgactcgaca ccgtgtcacc tacgtgccac tcctggggtc actcaggaca gccagacgc	3360
5	agctgagtcg gaagctcccg gggacgacgc tgactgccct ggaggccgca gccaaccgg	3420
	cactgccctc agacttcaag accatcctgg actgatggcc acccgcccac agccaggccg	3480
	agagcagaca ccagcagccc tgtcacgccc ggctctacgt cccaggggagg gaggggaggc	3540
	ccacaccccag gcccgcaccg ctggggagtct gaggcctgag tgagtgtttg gccgaggcct	3600
	gcatgtccgg ctgaaggctg agtgtccggc tgaggcctga gcgagtgtcc agccaagggc	3660
10	tgagtgtcca gcacacctgc cgtcttcact tccccacagg ctggcgctcg gctccacccc	3720
	agggccagct tttcctcacc aggagcccgg cttccactcc ccacatagga atagtccatc	3780
	cccagattcg ccattgttca cccctcgccc tgccctcctt tgccttcac cccaccatc	3840
	caggtggaga ccctgagaag gacctgggga gctctgggaa tttggagtga ccaaagggtg	3900
	gccctgtaca cagggcagga ccctgcacct ggatgggggt ccctgtgggt caaattgggg	3960
15	ggagggtgctg tgggagtaaa atactgaata tatgagtttt tcagttttga aaaaaaaaaa	4020
	aaaaaaaa	4027
	<210> 216	
	<211> 19	
	<212> ДНК	
20	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид"	
25	<400> 216	
	ggagggtccct caccttcta	19
	<210> 217	
	<211> 19	
	<212> ДНК	
30	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид"	
35	<400> 217	
	cggaggatct tatgctgaa	19
	<210> 218	
	<211> 19	
	<212> ДНК	
40	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид"	
45	<400> 218	
	cccgcttcca gatcataca	19
	<210> 219	
	<211> 19	

<212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 5 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 219
 ggagacstca acaagatat 19
 <210> 220
 10 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 15 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 220
 aaggcatggt cattggtat 19
 <210> 221
 20 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 25 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 221
 gcatggtcat tggatatcat 19
 <210> 222
 30 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 35 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 222
 ggatcattggt atcatgagt 19
 <210> 223
 40 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 45 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 223
 cctagtgggt atccctgta 19

<210> 224
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 5 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 224
 10 gaggatggac attgttctt 19
 <210> 225
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 15 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 225
 20 gcatgcaggc tacagttca 19
 <210> 226
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 25 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 226
 30 ccagcacatg cactgttga 19
 <210> 227
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 35 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 227
 40 cacatgcast gttgagtga 19
 <210> 228
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 45 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"

<400> 228
 ctggaggtcc ctcaccttct a 21
 <210> 229
 <211> 21
 5 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 10 олигонуклеотид"
 <400> 229
 gtcggaggat cttatgctga a 21
 <210> 230
 <211> 21
 15 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 20 олигонуклеотид"
 <400> 230
 tgcccgccttc sagatcatatc a 21
 <210> 231
 <211> 21
 25 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 30 олигонуклеотид"
 <400> 231
 ctggagacst саасааgata t 21
 <210> 232
 <211> 21
 35 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 40 олигонуклеотид"
 <400> 232
 tcaaggcatg gtcattggta t 21
 <210> 233
 <211> 21
 45 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 233
 aggcatgggtc attggtatca t 21
 5 <210> 234
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 10 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 234
 atgggtcattg gtatcatgag t 21
 15 <210> 235
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 20 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 235
 gccctagtgg gtatccctgt a 21
 25 <210> 236
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 30 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 236
 atgaggatgg acattgttct t 21
 35 <210> 237
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 40 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 237
 gagcatgcag gctacagttc a 21
 45 <210> 238
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 5 <400> 238
 ttccagcaca tgcactgttg a 21
 <210> 239
 <211> 21
 <212> ДНК
 10 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 15 <400> 239
 agcacatgca ctgttgagtg a 21
 <210> 240
 <211> 21
 <212> ДНК
 20 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 25 <400> 240
 tagaagggtga gggacctcca g 21
 <210> 241
 <211> 21
 <212> ДНК
 30 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 35 <400> 241
 ttcagcataa gatsctccga c 21
 <210> 242
 <211> 21
 <212> ДНК
 40 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 45 <400> 242
 tgtatgatct ggaagcgggc a 21
 <210> 243
 <211> 21

<212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 5 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 243
 atatcttggt gaggtctcca g 21
 <210> 244
 10 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 15 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 244
 ataccaatga ccatgccttg a 21
 <210> 245
 20 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 25 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 245
 atgataccaa tgaccatgcc t 21
 <210> 246
 30 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 35 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 246
 atgggtcattg gtatcatgag t 21
 <210> 247
 40 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 45 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 247
 gccctagtagg gtatccctgt a 21

<210> 248
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 5 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 248
 10 atgaggatgg acattgttct t 21
 <210> 249
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 15 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 249
 20 gagcatgсag gctacagttc a 21
 <210> 250
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 25 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 250
 30 ttccagcaca tgсactgttg a 21
 <210> 251
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 35 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 251
 40 agсacatgсa ctggttgagtг a 21
 <210> 252
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 45 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"

<400> 252
 tagaaggtga gggacctcc 19
 <210> 253
 <211> 19
 5 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 10 олигонуклеотид"
 <400> 253
 ttcagcataa gatsctccg 19
 <210> 254
 <211> 19
 15 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 20 олигонуклеотид"
 <400> 254
 tgtatgatct ggaagcggg 19
 <210> 255
 <211> 19
 25 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 30 олигонуклеотид"
 <400> 255
 atatcttggt gaggtctcc 19
 <210> 256
 <211> 19
 35 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 40 олигонуклеотид"
 <400> 256
 ataccaatga ccatgcctt 19
 <210> 257
 <211> 19
 45 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 257
 atgataccaa tgaccatgc 19
 5 <210> 258
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 10 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 258
 atgggtcattg gtatcatga 19
 15 <210> 259
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 20 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 259
 gccctagtgg gtatccctg 19
 25 <210> 260
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 30 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 260
 atgaggatgg acattgttc 19
 35 <210> 261
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 40 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 261
 gagcatgcag gctacagtt 19
 45 <210> 262
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 5 <400> 262
 ttccagcaca tgcactggtt 19
 <210> 263
 <211> 19
 <212> ДНК
 10 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 15 <400> 263
 agcacatgca ctgttgagt 19
 <210> 264
 <211> 19
 <212> ДНК
 20 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 25 <400> 264
 ggccaggatg gttcttaga 19
 <210> 265
 <211> 19
 <212> ДНК
 30 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 35 <400> 265
 gcttcgtgct aaactggta 19
 <210> 266
 <211> 19
 <212> ДНК
 40 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 45 <400> 266
 gggcgtgact tccacatga 19
 <210> 267
 <211> 19

<212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 5 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 267
 caggsctaga gaagtttca 19
 <210> 268
 10 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 15 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 268
 cttggaaccc attcctgaa 19
 <210> 269
 20 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 25 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 269
 ggaacccatt cctgaaatt 19
 <210> 270
 30 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 35 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 270
 gaacccattc ctgaaatta 19
 <210> 271
 40 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 45 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 271
 aacccattcc tgaaattat 19

<210> 272
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 5 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 272
 10 acccattcct gaaattatt 19
 <210> 273
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 15 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 273
 20 cccattcctg aaattatatt 19
 <210> 274
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 25 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 274
 30 ctgtggttct attatatta 19
 <210> 275
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 35 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 275
 40 aaatatgaga gcatgctaa 19
 <210> 276
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 45 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"

<400> 276
 tctaagaacc atcctggcc 19
 <210> 277
 <211> 19
 5 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 10 олигонуклеотид"
 <400> 277
 taccagttta gcacgaagc 19
 <210> 278
 <211> 19
 15 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 20 олигонуклеотид"
 <400> 278
 tcatgtggaa gtcacgccc 19
 <210> 279
 <211> 19
 25 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 30 олигонуклеотид"
 <400> 279
 tgaaacttct ctaggcctg 19
 <210> 280
 <211> 19
 35 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 40 олигонуклеотид"
 <400> 280
 ttcaggaatg ggttccaag 19
 <210> 281
 <211> 19
 45 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 281
 aatttcagga atgggttcc 19
 5 <210> 282
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 10 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 282
 taatttcagg aatgggttc 19
 15 <210> 283
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 20 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 283
 ataatttcag gaatgggtt 19
 25 <210> 284
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 30 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 284
 aataatttca ggaatgggt 19
 35 <210> 285
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 40 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 285
 aaataatttc aggaatggg 19
 45 <210> 286
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 5 <400> 286
 taatataata gaaccasag 19
 <210> 287
 <211> 19
 <212> ДНК
 10 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 15 <400> 287
 ttagcatgct ctcataat 19
 <210> 288
 <211> 21
 <212> ДНК
 20 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 25 <400> 288
 gcggccagga tggttcttag a 21
 <210> 289
 <211> 21
 <212> ДНК
 30 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 35 <400> 289
 gagcttcgtg ctaaaactggt a 21
 <210> 290
 <211> 21
 <212> ДНК
 40 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 45 <400> 290
 acgggcgtga cttccacatg a 21
 <210> 291
 <211> 21

<212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 5 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 291
 tgcaggccta gagaagtttc a 21
 <210> 292
 10 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 15 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 292
 tccttggaac ccattcctga a 21
 <210> 293
 20 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 25 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 293
 ttggaaccca ttcctgaaat t 21
 <210> 294
 30 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 35 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 294
 tggaaccat tcctgaaatt a 21
 <210> 295
 40 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 45 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 295
 ggaaccatt cctgaaatta t 21

<210> 296
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 5 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 296
 10 gaacccattc ctgaaattat t 21
 <210> 297
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 15 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 297
 20 aacccattcc tgaaattatt t 21
 <210> 298
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 25 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 298
 30 ccctgtgggtt ctattatatt a 21
 <210> 299
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 35 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 299
 40 ttaaatatga gagcatgcta a 21
 <210> 300
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 45 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"

<400> 300
 tctaagaacc atcctggccg c 21
 <210> 301
 <211> 21
 5 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 10 олигонуклеотид"
 <400> 301
 taccagttta gcacgaagct c 21
 <210> 302
 <211> 21
 15 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 20 олигонуклеотид"
 <400> 302
 tcatgtggaa gtcacgcccg t 21
 <210> 303
 <211> 21
 25 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 30 олигонуклеотид"
 <400> 303
 tgaaacttct ctaggcctgc a 21
 <210> 304
 <211> 21
 35 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 40 олигонуклеотид"
 <400> 304
 ttcaggaatg ggttccaagg a 21
 <210> 305
 <211> 21
 45 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 305
 aatttcagga atgggttcca a 21
 5 <210> 306
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 10 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 306
 taatttcagg aatgggttcc a 21
 15 <210> 307
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 20 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 307
 ataatttcag gaatgggttc c 21
 25 <210> 308
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 30 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 308
 aataatttca ggaatgggtt c 21
 35 <210> 309
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 40 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 309
 aaataatttc aggaatgggt t 21
 45 <210> 310
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 5 <400> 310
 taatataata gaaccacagg g 21
 <210> 311
 <211> 21
 <212> ДНК
 10 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 олигонуклеотид"
 15 <400> 311
 ttagcatgct ctcatatatta a 21
 <210> 312
 <211> 150
 <212> ДНК
 20 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 полинуклеотид"
 25 <400> 312
 аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа 60
 аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа аааааааааа 120
 аааааааааа аааааааааа аааааааааа 150
 <210> 313
 30 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 35 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 313
 Arg Gly Asp Ser
 1
 40 <210> 314
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 45 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 314

Ser Tyr Ala Ile Ser
 1 5
 <210> 315
 <211> 5
 5 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 10 пептид"
 <400> 315
 Asp Tyr Ala Met His
 1 5
 <210> 316
 15 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 20 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 316
 Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly
 1 5
 25 <210> 317
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 30 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 317
 Ser Tyr Trp Met Ser
 35 1 5
 <210> 318
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 40 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 318
 45 Ser Gly Ser His Tyr Trp Asn
 1 5
 <210> 319
 <211> 5

<212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 5 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 319
 Gly Tyr Tyr Trp Ser
 1 5
 10 <210> 320
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 15 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 320
 Ser Tyr Ser Met Asn
 20 1 5
 <210> 321
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 25 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 321
 30 Ser Tyr Glu Met Asn
 1 5
 <210> 322
 <211> 5
 <212> PRT
 35 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 40 <400> 322
 Asp His Val Met His
 1 5
 <210> 323
 <211> 5
 45 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 323
 Ser Tyr Ser Met Asn
 5 1 5
 <210> 324
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 10 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 324
 15 Ser Tyr Gly Leu His
 1 5
 <210> 325
 <211> 5
 <212> PRT
 20 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 25 <400> 325
 Ser Asn Tyr Met Thr
 1 5
 <210> 326
 <211> 5
 30 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 35 пептид"
 <400> 326
 Gly Tyr Tyr Ile Gln
 1 5
 <210> 327
 40 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 45 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 327
 Ser Tyr Glu Met Asn

1 5
 <210> 328
 <211> 17
 <212> PRT
 5 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 10 <400> 328
 Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 329
 15 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 20 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 329
 Leu Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 25 Gly
 <210> 330
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 30 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 330
 35 Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 <210> 331
 <211> 17
 <212> PRT
 40 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 45 <400> 331
 Asn Ile Asn Glu Asp Gly Ser Ala Lys Phe Tyr Val Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 332
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 5 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 <400> 332
 10 Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Glu Asn
 1 5 10 15
 <210> 333
 <211> 16
 <212> PRT
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 20 <400> 333
 Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 <210> 334
 <211> 17
 25 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 30 <400> 334
 Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 35 <210> 335
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 40 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 <400> 335
 Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 45 1 5 10 15
 Gly
 <210> 336
 <211> 17

<212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 5 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 <400> 336
 Tyr Ile His Ala Ala Asn Gly Gly Thr His Tyr Ser Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 10 Asp
 <210> 337
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 15 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 <400> 337
 20 Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 338
 <211> 17
 25 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 30 <400> 338
 Leu Ile Glu Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 35 <210> 339
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 40 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 <400> 339
 Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys Gly
 45 1 5 10 15
 <210> 340
 <211> 17
 <212> PRT

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 5 пептид"
 <400> 340
 Trp Ile Asp Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly
 10 <210> 341
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 15 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 341
 Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 20 1 5 10 15
 Gly
 <210> 342
 <211> 11
 <212> PRT
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 30 <400> 342
 Asp Leu Glu Met Ala Thr Ile Met Gly Gly Tyr
 1 5 10
 <210> 343
 <211> 9
 35 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 40 пептид"
 <400> 343
 Val Phe Asp Ser Tyr Tyr Met Asp Val
 1 5
 <210> 344
 45 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 <400> 344
 5 Pro Gly Thr Tyr Tyr Asp Phe Leu Ser Gly Tyr Tyr Pro Phe Tyr
 1 5 10 15
 <210> 345
 <211> 7
 <212> PRT
 10 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 15 <400> 345
 Asp Leu Arg Ser Gly Arg Tyr
 1 5
 <210> 346
 <211> 13
 20 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 25 <400> 346
 Gly Thr Ala Thr Phe Asp Trp Asn Phe Pro Phe Asp Ser
 1 5 10
 <210> 347
 30 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 35 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 <400> 347
 Gly Ser Gly Leu Val Val Tyr Ala Ile Arg Val Gly Ser Gly Trp Phe
 1 5 10 15
 40 Asp Tyr
 <210> 348
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 45 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"

<400> 348
 Asp Pro Ser Ser Ser Gly Ser Tyr Tyr Met Glu Asp Ser Tyr Tyr Tyr
 1 5 10 15
 Gly Met Asp Val
 5 20
 <210> 349
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 10 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 349
 15 Glu Ala Leu Gly Ser Ser Trp Glu
 1 5
 <210> 350
 <211> 10
 <212> PRT
 20 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 25 <400> 350
 Gly Gly Tyr Asn Ser Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5 10
 <210> 351
 <211> 12
 30 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 35 пептид"
 <400> 351
 Asp Leu Ser Val Arg Ala Ile Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5 10
 <210> 352
 40 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 45 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 352
 Glu Gly Asn Glu Asp Leu Ala Phe Asp Ile

1 5 10
 <210> 353
 <211> 19
 <212> PRT
 5 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 10 <400> 353
 Asp Arg Leu Tyr Cys Gly Asn Asn Cys Tyr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
 1 5 10 15
 Met Asp Val
 <210> 354
 15 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 20 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 <400> 354
 Asp Ser Tyr Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10
 25 <210> 355
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 30 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 <400> 355
 Asp Pro Tyr Ser Ser Ser Trp His Asp Ala Phe Asp Ile
 35 1 5 10
 <210> 356
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 40 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 <400> 356
 45 Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
 1 5 10
 <210> 357
 <211> 16

<212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 5 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический peptide"
 <400> 357
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
 1 5 10 15
 10 <210> 358
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 15 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 <400> 358
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
 20 1 5 10
 <210> 359
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 25 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 <400> 359
 30 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ser Phe Leu Ala
 1 5 10
 <210> 360
 <211> 11
 <212> PRT
 35 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 40 <400> 360
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
 1 5 10
 <210> 361
 <211> 11
 45 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 <400> 361
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
 5 1 5 10
 <210> 362
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 10 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 <400> 362
 15 Thr Gly Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn Tyr Val Gln
 1 5 10
 <210> 363
 <211> 11
 <212> PRT
 20 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 25 <400> 363
 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
 1 5 10
 <210> 364
 <211> 11
 30 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 35 <400> 364
 Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 1 5 10
 <210> 365
 40 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 45 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 <400> 365
 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5 10
 <210> 366
 <211> 11
 <212> PRT
 5 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 10 <400> 366
 Gln Ala Ser Gln Phe Ile Lys Lys Asn Leu Asn
 1 5 10
 <210> 367
 <211> 11
 15 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 20 пептид"
 <400> 367
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
 1 5 10
 <210> 368
 25 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 30 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 368
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
 1 5 10
 35 <210> 369
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 40 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 369
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 45 1 5 10
 <210> 370
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 5 пептид"
 <400> 370
 Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 371
 10 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 15 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 371
 Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser
 1 5
 20 <210> 372
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 25 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 372
 Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
 30 1 5
 <210> 373
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 35 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 373
 40 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5
 <210> 374
 <211> 7
 <212> PRT
 45 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический

пептид"

<400> 374
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

5 <210> 375
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 10 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 375
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 15 1 5
 <210> 376
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 20 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 376
 25 Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 377
 <211> 7
 <212> PRT
 30 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <221> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 35 <400> 377
 Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr
 1 5
 <210> 378
 <211> 7
 40 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 45 пептид"
 <400> 378
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

<210> 379
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 5 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 379
 10 Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr
 1 5
 <210> 380
 <211> 7
 <212> PRT
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 20 <400> 380
 Asp Ala Ser Ser Leu Gln Thr
 1 5
 <210> 381
 <211> 7
 25 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 30 пептид"
 <400> 381
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5
 <210> 382
 35 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 40 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 382
 Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
 1 5
 45 <210> 383
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 5 <400> 383
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5
 <210> 384
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 15 пептид"
 <400> 384
 Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Leu Asp Val Val
 1 5 10
 <210> 385
 20 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 25 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 385
 Met Gln Gly Thr His Trp Ser Phe Thr
 1 5
 30 <210> 386
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 35 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 386
 Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
 40 1 5
 <210> 387
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 45 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"

<400> 387
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Pro Thr
 1 5
 <210> 388
 5 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 10 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 388
 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
 1 5
 15 <210> 389
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 20 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 389
 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Trp Thr
 25 1 5 10
 <210> 390
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 30 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 390
 35 Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Asn Gln Val Val
 1 5 10
 <210> 391
 <211> 9
 <212> PRT
 40 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 45 <400> 391
 Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 392

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 5 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 392
 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
 10 1 5
 <210> 393
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 15 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 393
 20 Gln Gln Ala Tyr Ser Thr Pro Phe Thr
 1 5
 <210> 394
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 30 <400> 394
 Gln Gln His Asp Asn Leu Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 395
 <211> 10
 35 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 40 пептид"
 <400> 395
 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Leu Thr
 1 5 10
 <210> 396
 45 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 <400> 396
 5 Gln Gln Phe Asn Asn Tyr Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 397
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 15 <400> 397
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 398
 <211> 7
 20 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 25 <400> 398
 Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 1 5
 <210> 399
 30 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 35 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 <400> 399
 Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 1 5
 40 <210> 400
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 45 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 <400> 400

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr
 1 5
 <210> 401
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 10 пептид"
 <400> 401
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 1 5
 <210> 402
 15 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 20 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 402
 Gly Gly Pro Val Arg Ser Gly Ser His
 1 5
 25 <210> 403
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 30 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 403
 Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 35 1 5
 <210> 404
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 40 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 404
 45 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 1 5
 <210> 405
 <211> 7

<212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 5 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 405
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 1 5
 10 <210> 406
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 15 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 406
 Ala Asn Thr Phe Ser Asp His
 20 1 5
 <210> 407
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 25 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 407
 30 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 1 5
 <210> 408
 <211> 7
 <212> PRT
 35 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 40 <400> 408
 Gly Phe Thr Phe Asn Ser Tyr
 1 5
 <210> 409
 <211> 7
 45 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 409
 Gly Phe Asn Val Ser Ser Asn
 5 1 5
 <210> 410
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 10 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 410
 15 Gly Tyr Pro Phe Thr Gly Tyr
 1 5
 <210> 411
 <211> 7
 <212> PRT
 20 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 25 <400> 411
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 1 5
 <210> 412
 <211> 6
 30 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 35 пептид"
 <400> 412
 Ile Pro Ile Phe Gly Thr
 1 5
 <210> 413
 40 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 45 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 413
 Ser Gly Asp Gly Gly Ser

1 5
 <210> 414
 <211> 5
 <212> PRT
 5 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 10 <400> 414
 Tyr Tyr Ser Gly Ser
 1 5
 <210> 415
 <211> 6
 15 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 20 пептид"
 <400> 415
 Asn Glu Asp Gly Ser Ala
 1 5
 <210> 416
 25 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 30 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 416
 Tyr Tyr Ser Gly Ser
 1 5
 35 <210> 417
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 40 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 417
 Asn His Ser Gly Ser
 45 1 5
 <210> 418
 <211> 6
 <212> PRT

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 5 пептид"
 <400> 418
 Ser Ser Ser Ser Ser Tyr
 1 5
 <210> 419
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 15 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 419
 Ser Ser Ser Gly Ser Thr
 1 5
 20 <210> 420
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 25 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 420
 His Ala Ala Asn Gly Gly
 30 1 5
 <210> 421
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 35 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 421
 40 Ser Ser Ser Ser Ser Thr
 1 5
 <210> 422
 <211> 6
 <212> PRT
 45 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический

пептид"
 <400> 422
 Glu Tyr Asp Gly Ser Asn
 1 5
 5 <210> 423
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 10 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 423
 Tyr Ser Gly Gly Ala
 15 1 5
 <210> 424
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 20 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 424
 25 Asp Pro Asn Ser Gly Asn
 1 5
 <210> 425
 <211> 6
 <212> PRT
 30 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 35 <400> 425
 Ser Ser Ser Gly Ser Thr
 1 5
 <210> 426
 <211> 11
 40 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 45 пептид"
 <400> 426
 Asp Leu Glu Met Ala Thr Ile Met Gly Gly Tyr
 1 5 10

<210> 427
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 5 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 427
 10 Val Phe Asp Ser Tyr Tyr Met Asp Val
 1 5
 <210> 428
 <211> 15
 <212> PRT
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 20 <400> 428
 Pro Gly Thr Tyr Tyr Asp Phe Leu Ser Gly Tyr Tyr Pro Phe Tyr
 1 5 10 15
 <210> 429
 <211> 7
 25 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 30 пептид"
 <400> 429
 Asp Leu Arg Ser Gly Arg Tyr
 1 5
 <210> 430
 35 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 40 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 430
 Gly Thr Ala Thr Phe Asp Trp Asn Phe Pro Phe Asp Ser
 1 5 10
 45 <210> 431
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 5 <400> 431
 Gly Ser Gly Leu Val Val Tyr Ala Ile Arg Val Gly Ser Gly Trp Phe
 1 5 10 15
 Asp Tyr
 <210> 432
 10 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 15 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 <400> 432
 Asp Pro Ser Ser Ser Gly Ser Tyr Tyr Met Glu Asp Ser Tyr Tyr Tyr
 1 5 10 15
 20 Gly Met Asp Val
 20
 <210> 433
 <211> 8
 <212> PRT
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 30 <400> 433
 Glu Ala Leu Gly Ser Ser Trp Glu
 1 5
 <210> 434
 <211> 10
 35 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 40 <400> 434
 Gly Gly Tyr Asn Ser Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5 10
 <210> 435
 45 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 <400> 435
 5 Asp Leu Ser Val Arg Ala Ile Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5 10
 <210> 436
 <211> 10
 <212> PRT
 10 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 15 <400> 436
 Glu Gly Asn Glu Asp Leu Ala Phe Asp Ile
 1 5 10
 <210> 437
 <211> 19
 20 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 25 <400> 437
 Asp Arg Leu Tyr Cys Gly Asn Asn Cys Tyr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
 1 5 10 15
 Met Asp Val
 30 <210> 438
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 35 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 <400> 438
 Asp Ser Tyr Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 40 1 5 10
 <210> 439
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 45 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"

<400> 439
 Asp Pro Tyr Ser Ser Ser Trp His Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5 10
 <210> 440
 5 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 10 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 440
 Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr
 1 5 10
 15 <210> 441
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 20 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 441
 Ser Gln Ser Leu Val Tyr Thr Asp Gly Asn Thr Tyr
 25 1 5 10
 <210> 442
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 30 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 442
 35 Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
 1 5
 <210> 443
 <211> 8
 <212> PRT
 40 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 45 <400> 443
 Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ser Phe
 1 5
 <210> 444

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 5 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 444
 Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 10 1 5
 <210> 445
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 15 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 445
 20 Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 1 5
 <210> 446
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 30 <400> 446
 Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn Tyr
 1 5
 <210> 447
 <211> 7
 35 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 40 пептид"
 <400> 447
 Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 1 5
 <210> 448
 45 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 <400> 448
 5 Ser Gln Asp Ile Ser Ser Trp
 1 5
 <210> 449
 <211> 7
 <212> PRT
 10 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 15 <400> 449
 Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 1 5
 <210> 450
 <211> 7
 20 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 25 <400> 450
 Ser Gln Phe Ile Lys Lys Asn
 1 5
 <210> 451
 30 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 35 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 <400> 451
 Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 1 5
 40 <210> 452
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 45 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический пептид"
 <400> 452

Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
 1 5
 <210> 453
 <211> 8
 5 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 10 пептид"
 <400> 453
 Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
 1 5
 <210> 454
 15 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 20 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 454
 Asp Val Ser
 1
 25 <210> 455
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 30 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 455
 Lys Val Ser
 35 1
 <210> 456
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 40 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 456
 45 Ala Ala Ser
 1
 <210> 457
 <211> 3

<212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 5 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 457
 Gly Ala Ser
 1
 10 <210> 458
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 15 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 458
 Ala Ala Ser
 20 1
 <210> 459
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 25 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 459
 30 Ala Ala Ser
 1
 <210> 460
 <211> 3
 <212> PRT
 35 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 40 <400> 460
 Glu Asp Asn
 1
 <210> 461
 <211> 3
 45 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 461
 Asp Ala Ser
 5 1
 <210> 462
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 10 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 462
 15 Ala Ala Ser
 1
 <210> 463
 <211> 3
 <212> PRT
 20 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 25 <400> 463
 Asp Ala Ser
 1
 <210> 464
 <211> 3
 30 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 35 пептид"
 <400> 464
 Asp Ala Ser
 1
 <210> 465
 40 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 45 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 465
 Ala Ala Ser

1
 <210> 466
 <211> 3
 <212> PRT
 5 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 10 <400> 466
 Asp Ala Ser
 1
 <210> 467
 <211> 3
 15 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 20 пептид"
 <400> 467
 Gly Ala Ser
 1
 <210> 468
 25 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 30 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 468
 Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Leu Asp Val
 1 5
 35 <210> 469
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 40 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 469
 Gly Thr His Trp Ser Phe
 45 1 5
 <210> 470
 <211> 6
 <212> PRT

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 5 пептид"
 <400> 470
 Leu Asn Ser Tyr Pro Tyr
 1 5
 <210> 471
 10 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 15 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 471
 Tyr Gly Ser Ser Pro Pro
 1 5
 20 <210> 472
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 25 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 472
 Ser Tyr Ser Thr Pro Trp
 30 1 5
 <210> 473
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 35 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 473
 40 Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Trp
 1 5
 <210> 474
 <211> 7
 <212> PRT
 45 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический

пептид"
 <400> 474
 Tyr Asp Ser Ser Asn Gln Val
 1 5
 5 <210> 475
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 10 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 475
 Tyr Asp Asn Leu Pro Leu
 15 1 5
 <210> 476
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 20 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 476
 25 Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
 1 5
 <210> 477
 <211> 6
 <212> PRT
 30 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 35 <400> 477
 Ala Tyr Ser Thr Pro Phe
 1 5
 <210> 478
 <211> 6
 40 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 45 пептид"
 <400> 478
 His Asp Asn Leu Pro Leu
 1 5

<210> 479
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 5 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 479
 10 Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
 1 5
 <210> 480
 <211> 6
 <212> PRT
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 20 <400> 480
 Phe Asn Asn Tyr Pro Leu
 1 5
 <210> 481
 <211> 6
 25 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 30 пептид"
 <400> 481
 Tyr Gly Ser Ser Pro Leu
 1 5
 <210> 482
 35 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 40 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 полипептид"
 <400> 482
 Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
 1 5 10 15
 45 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
 35 40

<210> 483
 <211> 123
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 5 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 полинуклеотид"
 <400> 483
 10 aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgccgcccc 60
 gggccsaccc gcaagcatta ccagccctat gcccaccac gcgacttcgc agcctatcgc 120
 tcc 123
 <210> 484
 <211> 35
 15 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 20 полипептид"
 <400> 484
 Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro Asn Gly Glu Tyr
 1 5 10 15
 Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser Arg Leu Thr Asp
 25 20 25 30
 Val Thr Leu
 35
 <210> 485
 <211> 105
 30 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 35 полинуклеотид"
 <400> 485
 acaaaaaaga agtattcatc cagtgtgcac gaccctaacg gtgaatacat gttcatgaga 60
 gcagtgaaca cagccaaaaa atccagactc acagatgtga cccta 105
 <210> 486
 40 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 45 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <400> 486
 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

1 Lys Gly
 <210> 487
 <211> 521
 5 <212> ДНК
 <213> Unknown
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Unknown:
 10 Wild-type PGK promoter полинуклеотид"
 <400> 487
 accctctctt ccagccacta agccagttgc tccctcggct gacggctgca cgcgaggcct 60
 ccgaacgtct tacgccttgt ggcgcgcccg tccttgtccc ggggtgtgatg gcgggggtgtg 120
 gggcggaagg cgtggcgggg aagggccggc gacgagagcc gcgcgggacg actcgtcggc 180
 15 gataaccggg gtcgggtagc gccagccgcg cgacggtaac gagggaccgc gacaggcaga 240
 cgctcccatg atcactctgc acgccgaagg caaatagtgc aggccgtgcg gcgcttggcg 300
 ttccttgga gggctgaatc cccgcctcgt ccttcgcagc ggcccccg gtgttcccat 360
 cgccgcttct aggccactg cgacgcttgc ctgcacttct tacacgctct gggctccagc 420
 cgcggcgacg caaagggcct tgggtcgggg ctcgtcggcg cagggacgcg tttgggtccc 480
 20 gacggaacct tttccgcgtt ggggttgggg caccataagc t 521
 <210> 488
 <211> 118
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 25 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 полинуклеотид"
 <400> 488
 30 accctctctt ccagccacta agccagttgc tccctcggct gacggctgca cgcgaggcct 60
 ccgaacgtct tacgccttgt ggcgcgcccg tccttgtccc ggggtgtgatg gcgggggtg 118
 <210> 489
 <211> 221
 <212> ДНК
 35 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 полинуклеотид"
 40 <400> 489
 accctctctt ccagccacta agccagttgc tccctcggct gacggctgca cgcgaggcct 60
 ccgaacgtct tacgccttgt ggcgcgcccg tccttgtccc ggggtgtgatg gcgggggtgtg 120
 gggcggaagg cgtggcgggg aagggccggc gacgagagcc gcgcgggacg actcgtcggc 180
 gataaccggg gtcgggtagc gccagccgcg cgacggtaac g 221
 45 <210> 490
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид"
 5 <400> 490
 acccctctct ccagccacta agccagttgc tccctcggct gacggctgca cgcgaggcct 60
 ccgaacgtct tacgccttgt ggcgcgcccg tccttgctcc ggggtgtgatg gcgggggtgtg 120
 gggcgagggg cgtggcgggg aagggccggc gacgagagcc gcgcgggacg actcgtcggc 180
 gataaccggt gtcgggtagc gccagccgcg cgacggtaac gagggaccgc gacaggcaga 240
 10 cgctcccatg atcactctgc acgccgaagg caaatagtgc aggccgtgcg gcgcttggcg 300
 ttccttggaagg gggctgaatc cccg 324
 <210> 491
 <211> 422
 <212> ДНК
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид"
 20 <400> 491
 acccctctct ccagccacta agccagttgc tccctcggct gacggctgca cgcgaggcct 60
 ccgaacgtct tacgccttgt ggcgcgcccg tccttgctcc ggggtgtgatg gcgggggtgtg 120
 gggcgagggg cgtggcgggg aagggccggc gacgagagcc gcgcgggacg actcgtcggc 180
 gataaccggt gtcgggtagc gccagccgcg cgacggtaac gagggaccgc gacaggcaga 240
 25 cgctcccatg atcactctgc acgccgaagg caaatagtgc aggccgtgcg gcgcttggcg 300
 ttccttggaagg gggctgaatc cccgcctcgt ccttcgcagc ggcccccg gtgttcccat 360
 cgccgcttct agggccactg cgacgcttgc ctgcacttct tacacgctct ggggtcccagc 420
 cg 422
 <210> 492
 30 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 35 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический peptide"
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)..(3)
 40 <223> /replace=" "
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(3)
 <223> /примечание="Различные остатки, данные в последовательности, не имеют
 45 предпочтения перед остатками в аннотациях для различных позиций"
 <400> 492
 Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu
 1 5 10 15

Glu Asn Pro Gly Pro
 20
 <210> 493
 <211> 22
 5 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 10 пептид"
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)..(3)
 <223> /replace=" "
 15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(3)
 <223> /примечание="Различные остатки, данные в последовательности, не имеют
 предпочтения перед остатками в аннотациях для различных позиций"
 20 <400> 493
 Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
 1 5 10 15
 Glu Glu Asn Pro Gly Pro
 20
 25 <210> 494
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 30 <221> источник
 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический
 пептид"
 <220>
 <221> VARIANT
 35 <222> (1)..(3)
 <223> /replace=" "
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(3)
 40 <223> /примечание="Различные остатки, данные в последовательности, не имеют
 предпочтения перед остатками в аннотациях для различных позиций"
 <400> 494
 Gly Ser Gly Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp
 1 5 10 15
 45 Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
 20
 <210> 495
 <211> 25

<212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 5 <223> /примечание="Описание Искусственной последовательности: синтетический peptide"
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)..(3)
 10 <223> /replace=" "
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(3)
 15 <223> /примечание="Различные остатки, данные в последовательности, не имеют предпочтения перед остатками в аннотациях для различных позиций"
 <400> 495
 Gly Ser Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala
 1 5 10 15
 Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
 20 20 25

(57) Формула изобретения

1. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая химерный антигенный рецептор (CAR),

25 где CAR содержит CLL-1-связывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий костимулирующий домен и/или первичный сигнальный домен,

где указанный CLL-1-связывающий домен содержит
 определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (HC CDR1),
 30 определяющий комплементарность участок 2 тяжелой цепи (HC CDR2),
 определяющий комплементарность участок 3 тяжелой цепи (HC CDR3),
 определяющий комплементарность участок 1 легкой цепи (LC CDR1),
 определяющий комплементарность участок 2 легкой цепи (LC CDR2),
 определяющий комплементарность участок 3 легкой цепи (LC CDR3),
 35 аминокислотной последовательности CAR CLL-1, выбранной из CAR9 CLL-1, CAR6 CLL-1, CAR10 CLL-1, CAR11 CLL-1 и CAR12 CLL-1, где

(a) последовательностями CDR согласно нумерации Кабат являются:

(i) для CAR9 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:364, LC CDR2 с SEQ ID NO:378 и LC CDR3 с SEQ ID NO:392;

40 И

HC CDR1 с SEQ ID NO:322, HC CDR2 с SEQ ID NO:336 и HC CDR3 с SEQ ID NO:350;

(ii) для CAR6 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:361, LC CDR2 с SEQ ID NO:375 и LC CDR3 с SEQ ID NO:389;

И

45 HC CDR1 с SEQ ID NO:319; HC CDR2 с SEQ ID NO:333 и HC CDR3 с SEQ ID NO:347;

(iii) для CAR10 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:365, LC CDR2 с SEQ ID NO:379 и LC CDR3 с SEQ ID NO:393;

И

HC CDR1 с SEQ ID NO:323; HC CDR2 с SEQ ID NO:337 и HC CDR3 с SEQ ID NO:351;
(iv) для CAR11 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:366, LC CDR2 с SEQ ID NO:380 и LC CDR3 с SEQ ID NO:394;

и

5 HC CDR1 с SEQ ID NO:324; HC CDR2 с SEQ ID NO:338 и HC CDR3 с SEQ ID NO:352;

и

(v) для CAR12 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:367, LC CDR2 с SEQ ID NO:381 и LC CDR3 с SEQ ID NO:395;

и

10 HC CDR1 с SEQ ID NO:325; HC CDR2 с SEQ ID NO:339 и HC CDR3 с SEQ ID NO:353;

(b) последовательностями CDR согласно нумерации Чотия являются:

(i) для CAR9 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:448, LC CDR2 с SEQ ID NO:462 и LC CDR3 с SEQ ID NO:476;

и

15 HCL CDR1 с SEQ ID NO:406, HC CDR2 с SEQ ID NO:420 и HC CDR3 с SEQ ID NO:434;

(ii) для CAR6 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:445, LC CDR2 с SEQ ID NO:459 и LC CDR3 с SEQ ID NO:473;

и

HC CDR1 с SEQ ID NO:403; HC CDR2 с SEQ ID NO:417 и HC CDR3 с SEQ ID NO:431;

20 (iii) для CAR10 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:449, LC CDR2 с SEQ ID NO:463 и LC CDR3 с SEQ ID NO:477;

и

HC CDR1 с SEQ ID NO:407; HC CDR2 с SEQ ID NO:421 и HC CDR3 с SEQ ID NO:435;

(iv) для CAR11 CLL-1:

25 LC CDR1 с SEQ ID NO:450, LC CDR2 с SEQ ID NO:464 и LC CDR3 с SEQ ID NO:478;

и

HC CDR1 с SEQ ID NO:408; HC CDR2 с SEQ ID NO:422 и HC CDR3 с SEQ ID NO:436;

и

(v) для CAR12 CLL-1:

30 LC CDR1 с SEQ ID NO:451, LC CDR2 с SEQ ID NO:465 и LC CDR3 с SEQ ID NO:479;

и

HC CDR1 с SEQ ID NO:409; HC CDR2 с SEQ ID NO:423 и HC CDR3 с SEQ ID NO:437;

(с) последовательностями CDR согласно объединенной нумерации являются:

(i) для CAR9 CLL-1:

35 LC CDR1 с SEQ ID NO:164, LC CDR2 с SEQ ID NO:177 и LC CDR3 с SEQ ID NO:190;

и

HC CDR1 с SEQ ID NO:125, HC CDR2 с SEQ ID NO:138 и HC CDR3 с SEQ ID NO:151;

(ii) для CAR6 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:161, LC CDR2 с SEQ ID NO:174 и LC CDR3 с SEQ ID NO:187;

40 и

HC CDR1 с SEQ ID NO:122; HC CDR2 с SEQ ID NO:135 и HC CDR3 с SEQ ID NO:148;

(iii) для CAR10 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:165, LC CDR2 с SEQ ID NO:178 и LC CDR3 с SEQ ID NO:191;

и

45 HC CDR1 с SEQ ID NO:126; HC CDR2 с SEQ ID NO:139 и HC CDR3 с SEQ ID NO:152;

(iv) для CAR11 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:166, LC CDR2 с SEQ ID NO:179 и LC CDR3 с SEQ ID NO:192;

и

HC CDR1 с SEQ ID NO:127; HC CDR2 с SEQ ID NO:140 и HC CDR3 с SEQ ID NO:153;

и

(v) для CAR12 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:167, LC CDR2 с SEQ ID NO:180 и LC CDR3 с SEQ ID NO:193;

5 и

HC CDR1 с SEQ ID NO:128; HC CDR2 с SEQ ID NO:141 и HC CDR3 с SEQ ID NO:154.

2. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.1, где

CLL-1-связывающий домен содержит вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, которые содержат:

10 (i) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:86 и 73, соответственно; SEQ ID NO:83 и/или 70, соответственно; SEQ ID NO:87 и/или 74, соответственно; SEQ ID NO:88 и/или 75, соответственно; или SEQ ID NO:89 и/или 76, соответственно;

(ii) аминокислотную последовательность по меньшей мере с одной, двумя или тремя модификациями, но не более 30, 20 или 10 модификациями, в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:86 и/или 73, соответственно; SEQ ID NO:83 и/или 70, соответственно; SEQ ID NO:87 и/или 74, соответственно; SEQ ID NO:88 и/или 75, соответственно; или SEQ ID NO:89 и/или 76, соответственно; или

15 (iii) аминокислотную последовательность, которая на 95-99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:86 и/или 73, соответственно; SEQ ID NO:83 и/или 70, соответственно; SEQ ID NO:87 и/или 74, соответственно; SEQ ID NO:88 и/или 75, соответственно; или SEQ ID NO:89 и/или 76, соответственно.

3. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.1 или 2, где

вариабельная область легкой цепи и вариабельная область тяжелой цепи содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO:86 и 73, соответственно; SEQ ID NO:83 и 70, соответственно; SEQ ID NO:87 и 74, соответственно; SEQ ID NO:88 и 75, соответственно; или SEQ ID NO:89 и 76, соответственно.

4. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, где

указанный CLL-1-связывающий домен содержит:

30 (i) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:47, 44, 48, 49 или 50;

(ii) аминокислотную последовательность с по меньшей мере одной, двумя или тремя модификациями, но не более чем с 30, 20 или 10 модификациями в любой из SEQ ID NO: 47, 44, 48, 49 или 50; или

35 (iii) аминокислотную последовательность, которая на 95-99% идентична любой из SEQ ID NO:47, 44, 48, 49 или 50.

5. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, где

40 кодируемый CLL-1-связывающий домен содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:60, 57, 61, 62 или 63, или последовательность, которая на 95-99% идентична им.

6. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, где

45 кодируемый CAR включает трансмембранный домен, который содержит трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и CD154.

7. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов,

где

(i) кодируемый трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более чем 20, 10 или 5 модификаций, в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:6, или последовательность, которая на 95-99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:6; или

(ii) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая трансмембранный домен, содержит последовательность SEQ ID NO:17 или последовательность, которая на 95-99% идентична ей.

8. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, где

кодируемый CLL-1-связывающий домен соединен с трансмембранным доменом посредством шарнирной области.

9. Молекула нуклеиновой кислоты по п.8, где:

(i) кодируемый шарнирный участок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 или последовательность, которая на 95-99% идентична ей; или

(ii) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая шарнирную область, содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:13 или последовательность, которая на 95-99% идентична ей.

10. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, где

кодируемый костимулирующий домен представляет собой функциональный сигнальный домен, полученный из белка, выбранного из группы, состоящей из молекулы МНС класса I, белков рецептора TNF, иммуноглобулиноподобных белков, цитокиновых рецепторов, интегринов, молекул, передающих сигнал активации лимфоцитов (белки SLAM), рецепторов, активирующих NK-клетки, BTLA, рецептора лиганда Toll, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRP1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8альфа, CD8бета, IL2R бета, IL2R гамма, IL7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a и лиганда, который специфически связывается с CD83.

11. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.10, где

кодируемый костимулирующий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 или аминокислотную последовательность меньшей мере с одной, двумя или тремя модификациями, но не более чем с 20, 10 или 5 модификациями, аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7, или последовательность, которая на 95-99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7.

12. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.10, где

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая костимулирующий домен, содержит последовательность SEQ ID NO:18 или последовательность, которая на 95-99% идентична ей.

13. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, где

кодируемый внутриклеточный сигнальный домен содержит функциональный сигнальный домен 4-1BB и/или функциональный сигнальный домен CD3 дзета.

5 14. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, где кодируемый внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 и/или последовательность SEQ ID NO:9 или SEQ ID NO:10; или аминокислотную последовательность с по меньшей мере одной, двумя или тремя модификациями, но не более чем с 20, 10 или 5 модификациями в аминокислотной
10 последовательности SEQ ID NO:7 и/или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9 или SEQ ID NO:10, или последовательность, которая на 95-99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7 и/или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9 или SEQ ID NO:10.

15 15. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, где

кодируемый внутриклеточный сигнальный домен содержит последовательность SEQ ID NO:7 и последовательность SEQ ID NO:9 или SEQ ID NO:10,

где последовательности, содержащие внутриклеточный сигнальный домен, экспрессируются в одной рамке и в виде одной полипептидной цепи.

20 16. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, где

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая внутриклеточный сигнальный домен, содержит последовательность SEQ ID NO:18 или последовательность, которая на 95-99% идентична ей, и/или последовательность SEQ ID NO:20 или SEQ ID NO:21

25 или последовательность, которая на 95-99% идентична им.

17. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, дополнительно содержащая лидерную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1.

30 18. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, которая кодирует CAR, содержащий:

(i) любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:99, 96, 100, 101 или 102;

(ii) любую аминокислотную последовательность с по меньшей мере одной, двумя или тремя модификациями, но не более чем с 30, 20 или 10 модификациями в любой из
35 SEQ ID NO:99, 96, 100, 101 или 102; или

(iii) любую аминокислотную последовательность, которая на 95-99% идентична любой из SEQ ID NO:99, 96, 100, 101 или 102.

19. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, содержащая любую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:112, 109, 113, 114
40 или 115 или нуклеотидную последовательность, которая на 95-99% идентична любой из SEQ ID NO:112, 109, 113, 114 или 115.

20. Полипептидная молекула, кодируемая молекулой нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-19.

21. Полипептид химерного антигенного рецептора (CAR), где

45 CAR содержит антитело или фрагмент антитела, который включает CLL-1-связывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий костимулирующий домен и/или первичный сигнальный домен, где CLL-1-связывающий домен содержит

определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (HC CDR1),
определяющий комплементарность участок 2 тяжелой цепи (HC CDR2),
определяющий комплементарность участок 3 тяжелой цепи (HC CDR3),
определяющий комплементарность участок 1 легкой цепи (LC CDR1),
определяющий комплементарность участок 2 легкой цепи (LC CDR2),
определяющий комплементарность участок 3 легкой цепи (LC CDR3),
аминокислотной последовательности CAR CLL-1, выбранной из CAR9 CLL-1, CAR6
CLL-1, CAR10 CLL-1, CAR11 CLL-1 и CAR12 CLL-1, где

(а) последовательностями CDR согласно нумерации Кабат являются:

(i) для CLL-1 CAR9:

LC CDR1 с SEQ ID NO:364, LC CDR2 с SEQ ID NO:378 и LC CDR3 с SEQ ID NO:392;

и

HC CDR1 с SEQ ID NO:322, HC CDR2 с SEQ ID NO:336 и HC CDR3 с SEQ ID NO:350;

(ii) для CAR6 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:361, LC CDR2 с SEQ ID NO:375 и LC CDR3 с SEQ ID NO:389;

и

HC CDR1 с SEQ ID NO:319; HC CDR2 с SEQ ID NO:333 и HC CDR3 с SEQ ID NO:347;

(iii) для CAR10 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:365, LC CDR2 с SEQ ID NO:379 и LC CDR3 с SEQ ID NO:393;

и

HC CDR1 с SEQ ID NO:323; HC CDR2 с SEQ ID NO:337 и HC CDR3 с SEQ ID NO:351;

(iv) для CAR11 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:366, LC CDR2 с SEQ ID NO:380 и LC CDR3 с SEQ ID NO:394;

и

HC CDR1 с SEQ ID NO:324; HC CDR2 с SEQ ID NO:338 и HC CDR3 с SEQ ID NO:352;

и

(v) для CAR12 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:367, LC CDR2 с SEQ ID NO:381 и LC CDR3 с SEQ ID NO:395;

и

HC CDR1 с SEQ ID NO:325; HC CDR2 с SEQ ID NO:339 и HC CDR3 с SEQ ID NO:353;

(b) последовательностями CDR согласно нумерации Чотия являются:

(i) для CAR9 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:448, LC CDR2 с SEQ ID NO:462 и LC CDR3 с SEQ ID NO:476;

и

HC CDR1 с SEQ ID NO:406, HC CDR2 с SEQ ID NO:420 и HC CDR3 с SEQ ID NO:434;

(ii) для CAR6 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:445, LC CDR2 с SEQ ID NO:459 и LC CDR3 с SEQ ID NO:473;

и

HC CDR1 с SEQ ID NO:403; HC CDR2 с SEQ ID NO:417 и HC CDR3 с SEQ ID NO:431;

(iii) для CAR10 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:449, LC CDR2 с SEQ ID NO:463 и LC CDR3 с SEQ ID NO:477;

и

HC CDR1 с SEQ ID NO:407; HC CDR2 с SEQ ID NO:421 и HC CDR3 с SEQ ID NO:435;

(iv) для CAR11 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:450, LC CDR2 с SEQ ID NO:464 и LC CDR3 с SEQ ID NO:478;

и

HC CDR1 с SEQ ID NO:408; HC CDR2 с SEQ ID NO:422 и HC CDR3 с SEQ ID NO:436;

и

(v) для CAR12 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:451, LC CDR2 с SEQ ID NO:465 и LC CDR3 с SEQ ID NO:479;

и

HC CDR1 с SEQ ID NO:409; HC CDR2 с SEQ ID NO:423 и HC CDR3 с SEQ ID NO:437;

5 (с) последовательностями CDR согласно объединенной нумерации являются:

(i) для CAR9 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:164, LC CDR2 с SEQ ID NO:177 и LC CDR3 с SEQ ID NO:190;

и

HC CDR1 с SEQ ID NO:125, HC CDR2 с SEQ ID NO:138 и HC CDR3 с SEQ ID NO:151;

10 (ii) для CAR6 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:161, LC CDR2 с SEQ ID NO:174 и LC CDR3 с SEQ ID NO:187;

и

HC CDR1 с SEQ ID NO:122; HC CDR2 с SEQ ID NO:135 и HC CDR3 с SEQ ID NO:148;

(iii) для CAR10 CLL-1:

15 LC CDR1 с SEQ ID NO:165, LC CDR2 с SEQ ID NO:178 и LC CDR3 с SEQ ID NO:191;

и

HC CDR1 с SEQ ID NO:126; HC CDR2 с SEQ ID NO:139 и HC CDR3 с SEQ ID NO:152;

(iv) для CAR11 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:166, LC CDR2 с SEQ ID NO:179 и LC CDR3 с SEQ ID NO:192;

20 и

HC CDR1 с SEQ ID NO:127; HC CDR2 с SEQ ID NO:140 и HC CDR3 с SEQ ID NO:153;

и

(v) для CAR12 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:167, LC CDR2 с SEQ ID NO:180 и LC CDR3 с SEQ ID NO:193;

25 и

HC CDR1 с SEQ ID NO:128; HC CDR2 с SEQ ID NO:141 и HC CDR3 с SEQ ID NO:154.

22. Полипептид CAR по п.21, где

CLL-1-связывающий домен содержит вариабельную область легкой цепи и/или вариабельную область тяжелой цепи, которые содержат:

30 (i) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:86 и/или 73, соответственно; SEQ ID NO:83 и/или 70, соответственно; SEQ ID NO:87 и/или 74, соответственно; SEQ ID NO:88 и/или 75, соответственно; или SEQ ID NO:89 и/или 76, соответственно;

(ii) аминокислотную последовательность с по меньшей мере одной, двумя или тремя модификациями, но не более 30, 20 или 10 модификациями, аминокислотной последовательности SEQ ID NO:86 и/или 73, соответственно; SEQ ID NO:83 и/или 70, соответственно; SEQ ID NO:87 и/или 74, соответственно; SEQ ID NO:88 и/или 75, соответственно; или SEQ ID NO:89 и/или 76, соответственно; или

35 (iii) аминокислотную последовательность, которая на 95-99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:86 и/или 73, соответственно; SEQ ID NO:83 и/или 70, соответственно; SEQ ID NO:87 и/или 74, соответственно; SEQ ID NO:88 и/или 75, соответственно; или SEQ ID NO:89 и/или 76, соответственно.

23. Полипептид CAR по п.21 или 22, где

вариабельная область легкой цепи и вариабельная область тяжелой цепи содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO:86 и 73, соответственно; SEQ ID NO: 83 и 70, соответственно; SEQ ID NO:87 и 74, соответственно; SEQ ID NO:88 и 75, соответственно; или SEQ ID NO:89 и 76, соответственно.

24. Полипептид CAR по любому из пп.21-23, содержащий:

(i) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ

ID NO:47, 44, 48, 49 или 50;

(ii) аминокислотную последовательность с по меньшей мере одной, двумя или тремя модификациями, но не более чем с 30, 20 или 10 модификациями любой из SEQ ID NO: 47, 44, 48, 49 или 50; или

5 (iii) аминокислотную последовательность, которая на 95-99% идентична любой из SEQ ID NO:47, 44, 48, 49 или 50.

25. Полипептид CAR по любому из пп.21-24, где

10 трансмембранный домен содержит трансмембранный домен из белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и CD154.

26. Полипептид CAR по любому из пп.21-25, где трансмембранный домен содержит:

(i) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6,

15 (ii) аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более чем 20, 10 или 5 модификаций аминокислотной последовательности SEQ ID NO:6, или

(iii) аминокислотную последовательность, которая на 95-99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:6.

27. Полипептид CAR по любому из пп.25-34, где

20 CLL-1-связывающий домен соединен с трансмембранным доменом посредством шарнирной области.

28. Полипептид CAR по п.27, где

шарнирный участок содержит SEQ ID NO:2 или последовательность, которая на 95-99% идентична ей.

25 29. Полипептид CAR по любому из пп.21-28, где костимулирующий домен представляет собой функциональный сигнальный домен, полученный из белка, выбранного из группы, состоящей из молекулы МНС класса I, белков рецептора TNF, иммуноглобулиноподобных белков, цитокиновых рецепторов, интегринов, молекул, передающих сигнал активации лимфоцитов (белки SLAM), рецепторов, активирующих
30 NK-клетки, BTLA, рецептора лиганда Toll, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8альфа, CD8бета, IL2R бета, IL2R гамма, IL7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE,
35 CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a и
40 лиганда, который специфически связывается с CD83.

30. Полипептид CAR по любому из пп.21-29, где

костимулирующий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с одной, двумя или тремя модификациями, но не более чем с 20, 10 или 5 модификациями, аминокислотной
45 последовательности SEQ ID NO:7, или последовательность, которая на 95-99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7.

31. Полипептид CAR по любому из пп.21-29, где

внутриклеточный сигнальный домен содержит функциональный сигнальный домен

4-1BB и/или функциональный сигнальный домен CD3 дзета.

32. Полипептид CAR по любому из пп.21-31, где

внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 и/или последовательность SEQ ID NO:9 или SEQ ID NO:10; или

5 аминокислотную последовательность с по меньшей мере одной, двумя или тремя модификациями, но не более чем с 20, 10 или 5 модификациями в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7 и/или аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9 или SEQ ID NO:10, или последовательность, которая на 95-99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7 и/или аминокислотной
10 последовательности SEQ ID NO:9 или SEQ ID NO:10.

33. Полипептид CAR по любому из пп.21-32, где

внутриклеточный сигнальный домен содержит последовательность SEQ ID NO:7 и последовательность SEQ ID NO:9 или SEQ ID NO:10, где последовательности, содержащие внутриклеточный сигнальный домен, экспрессируются в одной рамке
15 считывания и в виде одной полипептидной цепи.

34. Полипептид CAR по любому из пп.21-33, дополнительно содержащий лидерную последовательность, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1.

35. Полипептид CAR по любому из пп.21-34, содержащий:

20 (i) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:99, 96, 100, 101 или 102;
(ii) аминокислотную последовательность с по меньшей мере одной, двумя или тремя модификациями, но не более чем с 30, 20 или 10 модификациями в любой из SEQ ID NO: 99, 96, 100, 101 или 102; или

(iii) аминокислотную последовательность, которая на 95-99% идентична любой из
25 SEQ ID NO:99, 96, 100, 101 или 102.

36. CLL-1-связывающий домен, содержащий:

определяющий комплементарность участок 1 легкой цепи (LC CDR1),

определяющий комплементарность участок 2 легкой цепи (LC CDR2),

определяющий комплементарность участок 3 легкой цепи (LC CDR3)

30 аминокислотной последовательности легкой цепи анти-CLL-1-связывающего домена, как указано в Таблице 2, и

определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR1 HC),

определяющий комплементарность участок 2 тяжелой цепи (CDR2 HC) и

определяющий комплементарность участок 3 тяжелой цепи (CDR3 HC)

35 аминокислотной последовательности CAR CLL-1, выбранной из CAR9 CLL-1, CAR6 CLL-1, CAR10 CLL-1, CAR11 CLL-1 и CAR12 CLL-1, где

(a) последовательностями CDR согласно нумерации Кабат являются:

(i) для CAR9 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:364, LC CDR2 с SEQ ID NO:378 и LC CDR3 с SEQ ID NO:392;

40 и

HC CDR1 с SEQ ID NO:322, HC CDR2 с SEQ ID NO:336 и HC CDR3 с SEQ ID NO:350;

(ii) для CAR6 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:361, LC CDR2 с SEQ ID NO:375 и LC CDR3 с SEQ ID NO:389;

и

45 HC CDR1 с SEQ ID NO:319; HC CDR2 с SEQ ID NO:333 и HC CDR3 с SEQ ID NO:347;

(iii) для CAR10 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:365, LC CDR2 с SEQ ID NO:379 и LC CDR3 с SEQ ID NO:393;

и

HC CDR1 с SEQ ID NO:323; HC CDR2 с SEQ ID NO:337 и HC CDR3 с SEQ ID NO:351;
(iv) для CAR11 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:366, LC CDR2 с SEQ ID NO:380 и LC CDR3 с SEQ ID NO:394;

и

5 HC CDR1 с SEQ ID NO:324; HC CDR2 с SEQ ID NO:338 и HC CDR3 с SEQ ID NO:352;

и

(v) для CAR12 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:367, LC CDR2 с SEQ ID NO:381 и LC CDR3 с SEQ ID NO:395;

и

10 HC CDR1 с SEQ ID NO:325; HC CDR2 с SEQ ID NO:339 и HC CDR3 с SEQ ID NO:353;

(b) последовательностями CDR согласно нумерации Чотия являются:

(i) для CAR9 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:448, LC CDR2 с SEQ ID NO:462 и LC CDR3 с SEQ ID NO:476;

и

15 HCL CDR1 с SEQ ID NO:406, HC CDR2 с SEQ ID NO:420 и HC CDR3 с SEQ ID NO:434;

(ii) для CAR6 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:445, LC CDR2 с SEQ ID NO:459 и LC CDR3 с SEQ ID NO:473;

и

HC CDR1 с SEQ ID NO:403; HC CDR2 с SEQ ID NO:417 и HC CDR3 с SEQ ID NO:431;

20 (iii) для CAR10 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:449, LC CDR2 с SEQ ID NO:463 и LC CDR3 с SEQ ID NO:477;

и

HC CDR1 с SEQ ID NO:407; HC CDR2 с SEQ ID NO:421 и HC CDR3 с SEQ ID NO:435;

(iv) для CAR11 CLL-1:

25 LC CDR1 с SEQ ID NO:450, LC CDR2 с SEQ ID NO:464 и LC CDR3 с SEQ ID NO:478;

и

HC CDR1 с SEQ ID NO:408; HC CDR2 с SEQ ID NO:422 и HC CDR3 с SEQ ID NO:436;

и

(v) для CAR12 CLL-1:

30 LC CDR1 с SEQ ID NO:451, LC CDR2 с SEQ ID NO:465 и LC CDR3 с SEQ ID NO:479;

и

HC CDR1 с SEQ ID NO:409; HC CDR2 с SEQ ID NO:423 и HC CDR3 с SEQ ID NO:437;

(с) последовательностями CDR согласно объединенной нумерации являются:

(i) для CAR9 CLL-1:

35 LC CDR1 с SEQ ID NO:164, LC CDR2 с SEQ ID NO:177 и LC CDR3 с SEQ ID NO:190;

и

HC CDR1 с SEQ ID NO:125, HC CDR2 с SEQ ID NO:138 и HC CDR3 с SEQ ID NO:151;

(ii) для CAR6 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:161, LC CDR2 с SEQ ID NO:174 и LC CDR3 с SEQ ID NO:187;

40 и

HC CDR1 с SEQ ID NO:122; HC CDR2 с SEQ ID NO:135 и HC CDR3 с SEQ ID NO:148;

(iii) для CAR10 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:165, LC CDR2 с SEQ ID NO:178 и LC CDR3 с SEQ ID NO:191;

и

45 HC CDR1 с SEQ ID NO:126; HC CDR2 с SEQ ID NO:139 и HC CDR3 с SEQ ID NO:152;

(iv) для CAR11 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:166, LC CDR2 с SEQ ID NO:179 и LC CDR3 с SEQ ID NO:192;

и

HC CDR1 с SEQ ID NO:127; HC CDR2 с SEQ ID NO:140 и HC CDR3 с SEQ ID NO:153;

и

(v) для CAR12 CLL-1:

LC CDR1 с SEQ ID NO:167, LC CDR2 с SEQ ID NO:180 и LC CDR3 с SEQ ID NO:193;

5 и

HC CDR1 с SEQ ID NO:128; HC CDR2 с SEQ ID NO:141 и HC CDR3 с SEQ ID NO:154.

37. CLL-1-связывающий домен или химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий CLL-1-связывающий домен, который специфически связывается с CLL-1, где CLL1-связывающий домен содержит:

10 (i) вариабельную область тяжелой цепи CAR9 CLL-1, содержащую HC CDR1 с SEQ ID NO:322, HC CDR2 с SEQ ID NO:336 и HC CDR3 с SEQ ID NO:350; и

(ii) вариабельную область легкой цепи CAR9 CLL-1, содержащую LC CDR1 с SEQ ID NO:364, LC CDR2 с SEQ ID NO:378 и LC CDR3 с SEQ ID NO:392 с CLL-1-CAR9.

38. CLL-1-связывающий домен или полипептид CAR, содержащий CLL-1-связывающий домен, который специфически связывается с CLL-1, где CLL-1-связывающий домен содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:86, и вариабельную последовательность тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:73.

39. CLL-1-связывающий домен или полипептид CAR, содержащий CLL-1-связывающий домен, который специфически связывается с CLL-1, где CLL-1-связывающий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47.

40. Полипептид CAR, содержащий CLL-1-связывающий домен, который специфически связывается с CLL-1, где полипептид CAR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:99.

41. Молекула выделенной нуклеиновой кислоты, кодирующая CLL-1-связывающий домен по любому из пп.36-39 или полипептид CAR по любому из пп.21-35 и 37-40.

42. Вектор для экспрессии полипептида CAR по любому из пп.20-35 или 37-40 или CLL-связывающего домена по любому из пп.36-39 в клетке, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR по любому из пп.1-19 или 41,

30 где вектор выбран из группы, состоящей из ДНК-вектора, РНК-вектора, плазмиды, лентивирусного вектора, аденовирусного вектора или ретровирусного вектора.

43. Вектор по п.42, дополнительно содержащий промотор EF-1, содержащий последовательность SEQ ID NO:11.

44. Цитотоксическая иммунная эффекторная клетка, или природная клетка-киллер, 35 или популяция иммунных эффекторных клеток, содержащая цитотоксические иммунные эффекторные клетки или природные клетки-киллеры, экспрессирующая полипептид CAR по любому из пп.20-35 или 37-40, экспрессирующая CLL-1-связывающий домен по любому из пп.36-39, экспрессирующая нуклеиновую кислоту по любому из пп.1-19 или 41 или вектор по п.42 или 43.

45. Способ лечения млекопитающего, страдающего заболеванием, связанным с экспрессией CLL-1, включающий введение млекопитающему эффективного количества популяции иммунных эффекторных клеток, содержащей цитотоксические иммунные эффекторные клетки или природные клетки-киллеры, содержащие нуклеиновую кислоту CAR по любому из пп.1-19 или 41 или полипептид CAR по любому из пп.20-35 или 37- 45 40.

46. Способ по п.45, где заболеванием, связанным с экспрессией CLL-1, является:

(i) или злокачественное новообразование, или предраковое состояние, выбранное из одного или нескольких следующих состояний: миелодисплазии, синдрома

миелодисплазии или предлейкоза, или

(ii) несвязанное со злокачественным новообразованием заболевание, связанное с экспрессией CLL-1.

47. Способ по п.45 или 46, где заболевание представляет собой гематологическую опухоль.

48. Способ по любому из пп.45-47, где заболевание представляет собой острый лейкоз, выбранный из одного или нескольких следующих типов: острый миелоидный лейкоз (AML); острый лимфобластный В-клеточный лейкоз (В-клеточный острый лимфоидный лейкоз, BALL), острый лимфобластный Т-клеточный лейкоз (Т-клеточный острый лимфоидный лейкоз, TALL), В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), хронический миелоидный лейкоз (CML), миелодиспластический синдром, плазмоклеточная миелома или их комбинация.

49. Способ по любому из пп.45-48, где популяцию иммунных эффекторных клеток вводят в комбинации с одним или несколькими следующими средствами:

(i) со средством, которое повышает эффективность клетки, содержащей нуклеиновую кислоту CAR или полипептид CAR;

(ii) со средством, которое уменьшает интенсивность одного или нескольких побочных действий, связанных с введением клетки, содержащей нуклеиновую кислоту CAR или полипептид CAR; или

(iii) со средством, которое лечит заболевание, связанное с экспрессией CLL-1.

50. Способ по любому из пп.45-48, где химиотерапевтическое средство вводят перед введением популяции иммунных эффекторных клеток и, необязательно, где химиотерапевтическое средство усиливает экспрессию CLL-1 на злокачественных клетках или химиотерапевтическим средством является цитарабин.

51. Способ по п.49, где средство представляет собой ингибитор mTOR и пациенту вводят малую усиливающую иммунитет дозу ингибитора mTOR, например, RAD001 или рапамицина.

52. Способ по п.51, где ингибитор mTOR вводят в течение времени, достаточном для уменьшения доли PD-1-положительных Т-клеток, повышения доли PD-1-отрицательных Т-клеток или увеличения отношения PD-1-отрицательные Т-клетки/PD-1-положительные Т-клетки в периферийной крови пациента или в препарате Т-клеток, взятых у пациента.

53. Способ кондиционирования пациента перед трансплантацией клеток, включающий введение пациенту эффективного количества популяции иммунных эффекторных клеток, содержащей цитотоксические иммунные эффекторные клетки или природные клетки-киллеры, содержащие нуклеиновую кислоту CAR по любому из пп.1-19 или 41 или полипептид CAR по любому из пп.20-35 или 37-40.

54. Способ по п.53, где клеточная трансплантация представляет собой трансплантацию стволовых клеток, например трансплантацию гематopoэтических стволовых клеток или трансплантацию костного мозга.

55. Способ по п.53 или 54, где кондиционирование пациента перед трансплантацией клеток включает снижение числа CLL-1-экспрессирующих клеток у пациента, например нормальных CLL-1-экспрессирующих клеток или злокачественных CLL-1-экспрессирующих клеток.

56. Применение выделенной молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-19 или 41, молекулы полипептида CAR по любому из пп.20-35 или 37-40, вектора по п.42 или 43 или популяции иммунных эффекторных клеток по п.44 для получения лекарственного средства для терапии CAR.

57. Применение иммунной эффекторной клетки, или природной клетки-киллера, или

популяции иммунных эффекторных клеток или природных клеток-киллеров по п.44 для лечения заболевания, связанного с экспрессией CLL-1.

5

10

15

20

25

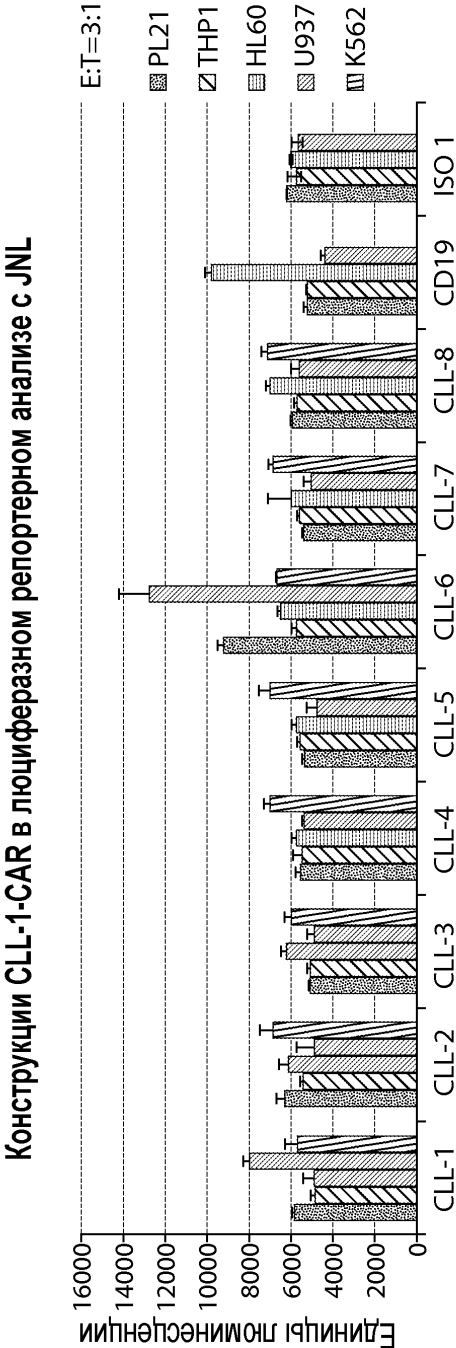
30

35

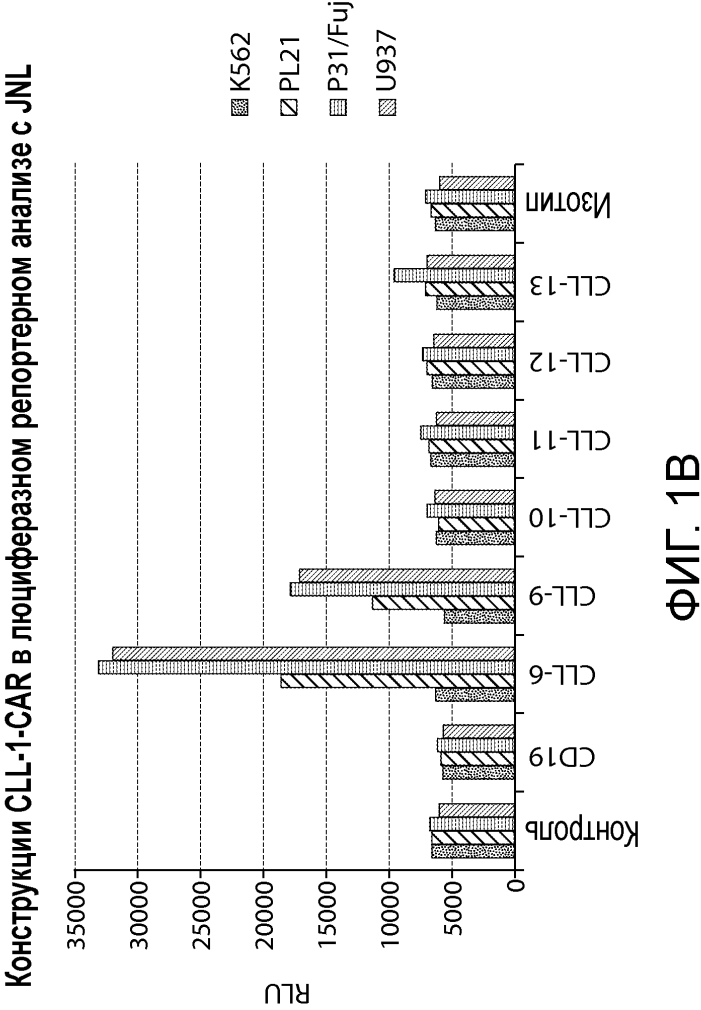
40

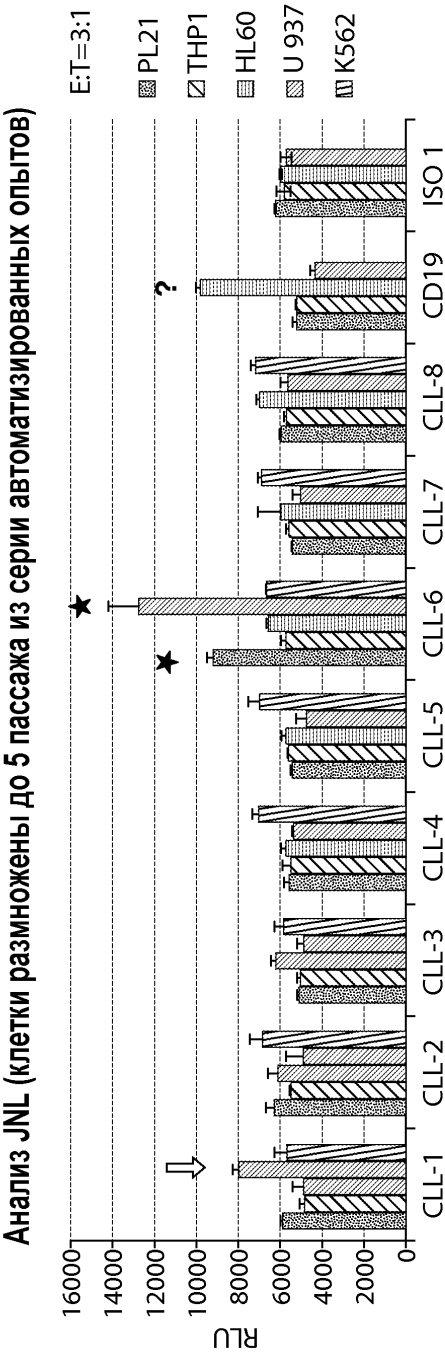
45

1/56



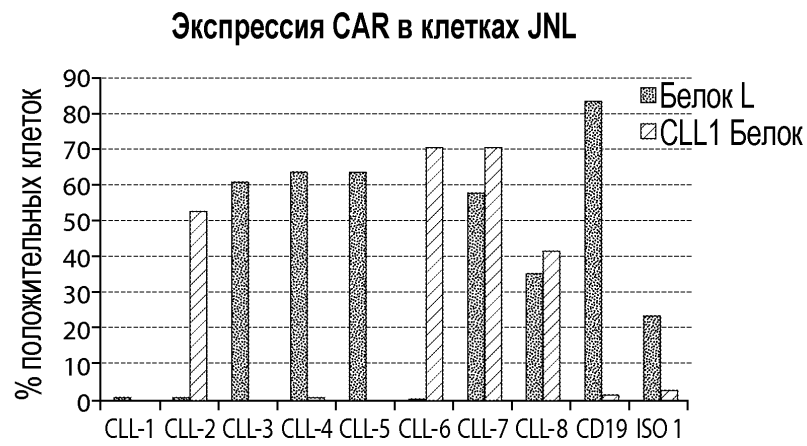
ФИГ. 1А



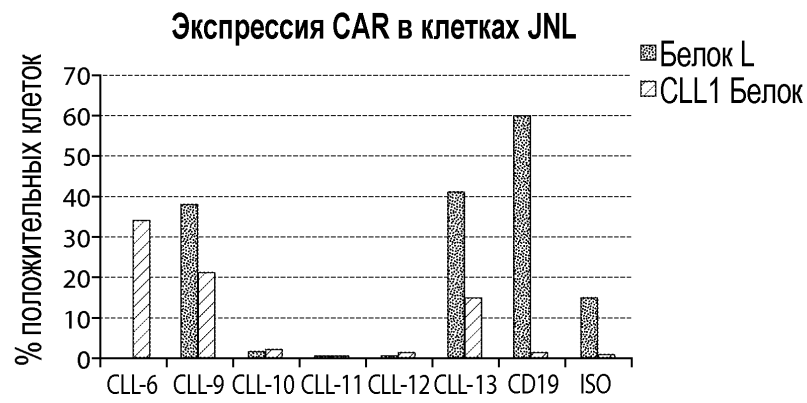


ФИГ. 1С

4/56

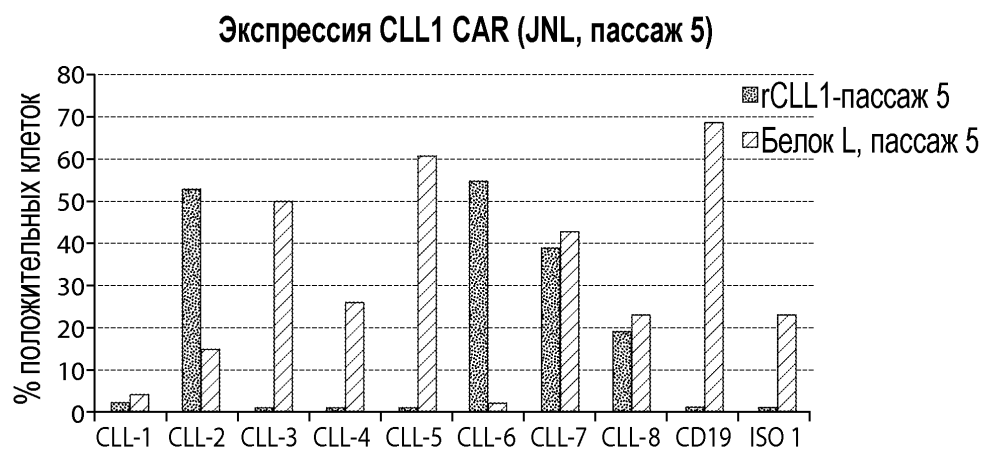


ФИГ. 2А

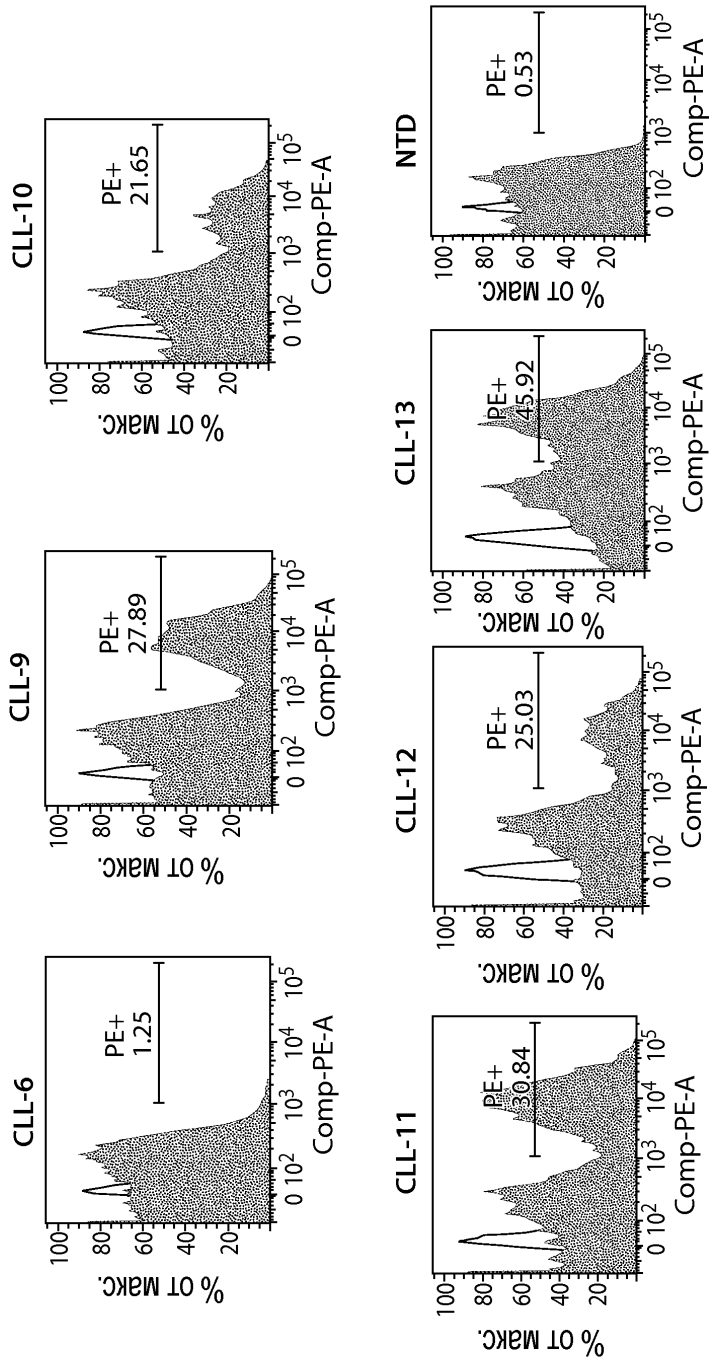


ФИГ. 2В

5/56

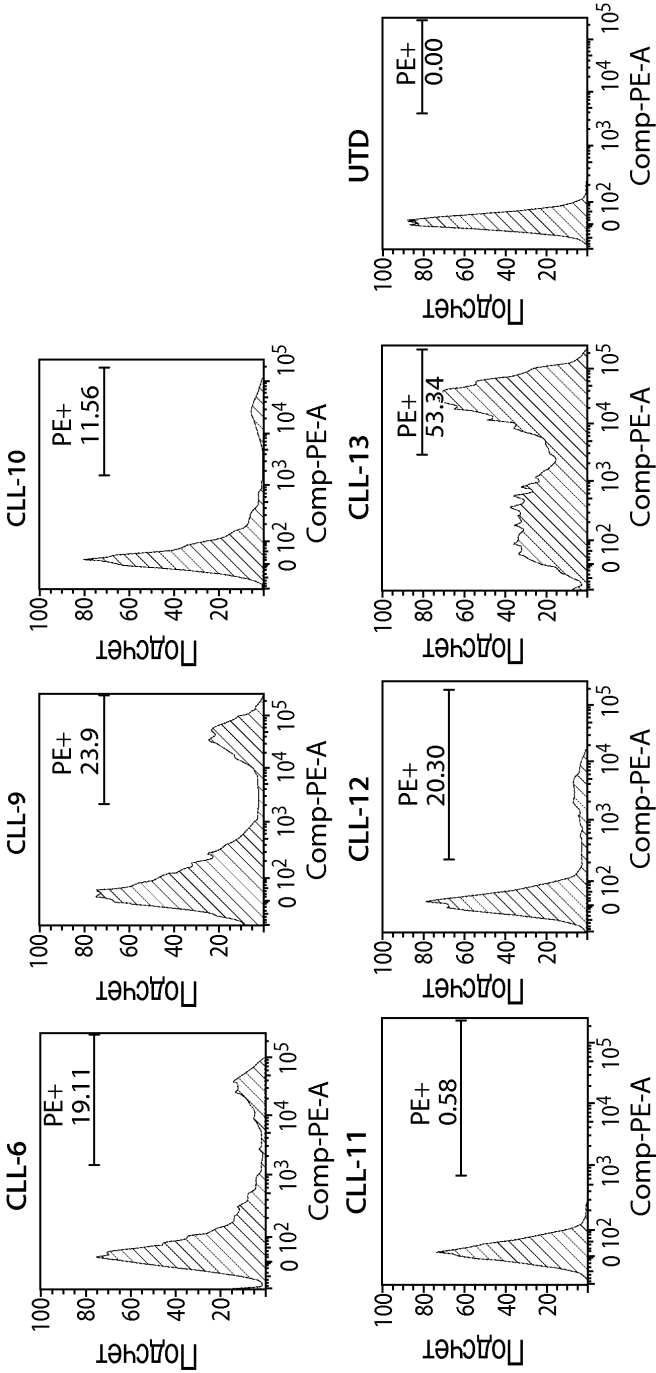


ФИГ. 2С



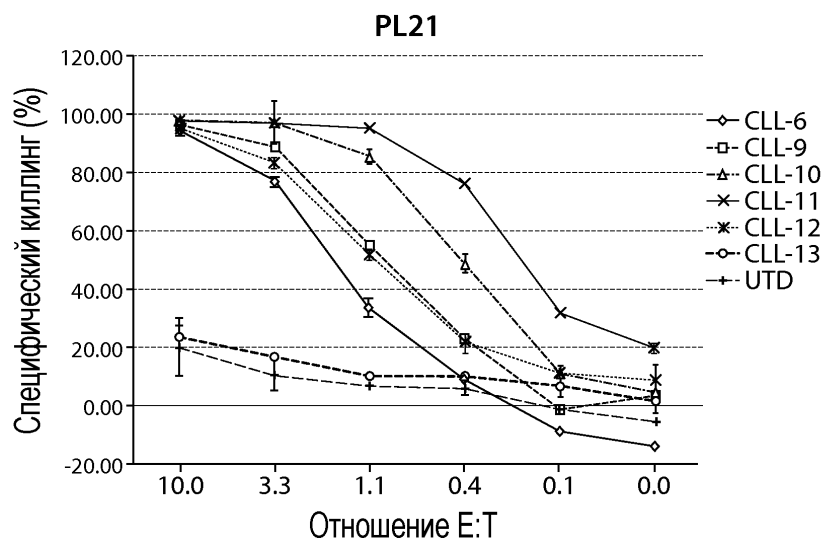
ФИГ. 3А

7/56

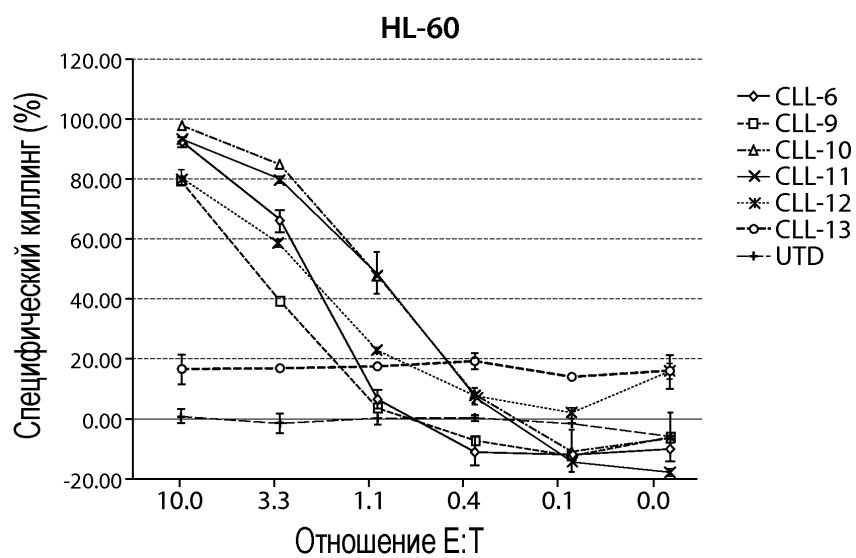


ФИГ. 3В

8/56

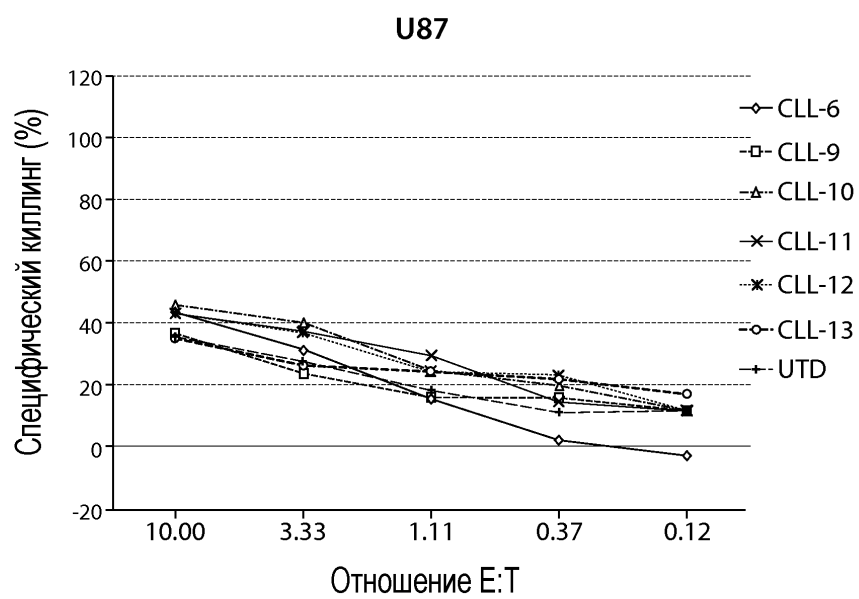


ФИГ. 4А



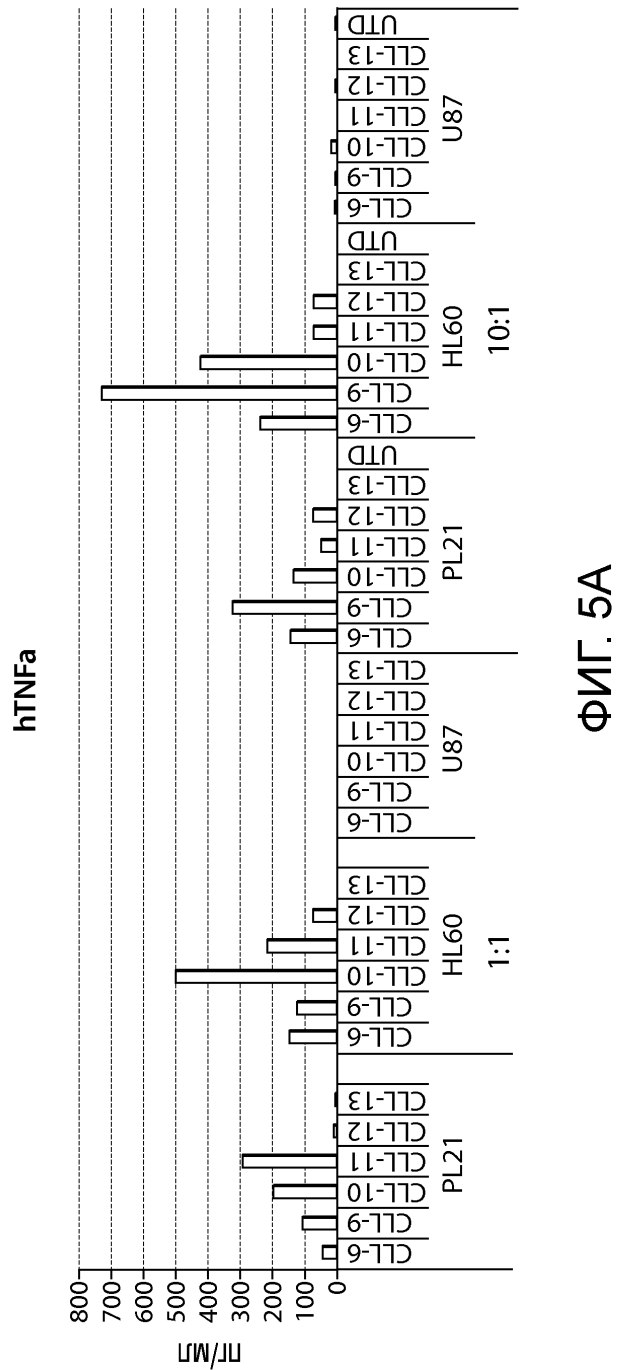
ФИГ. 4В

9/56

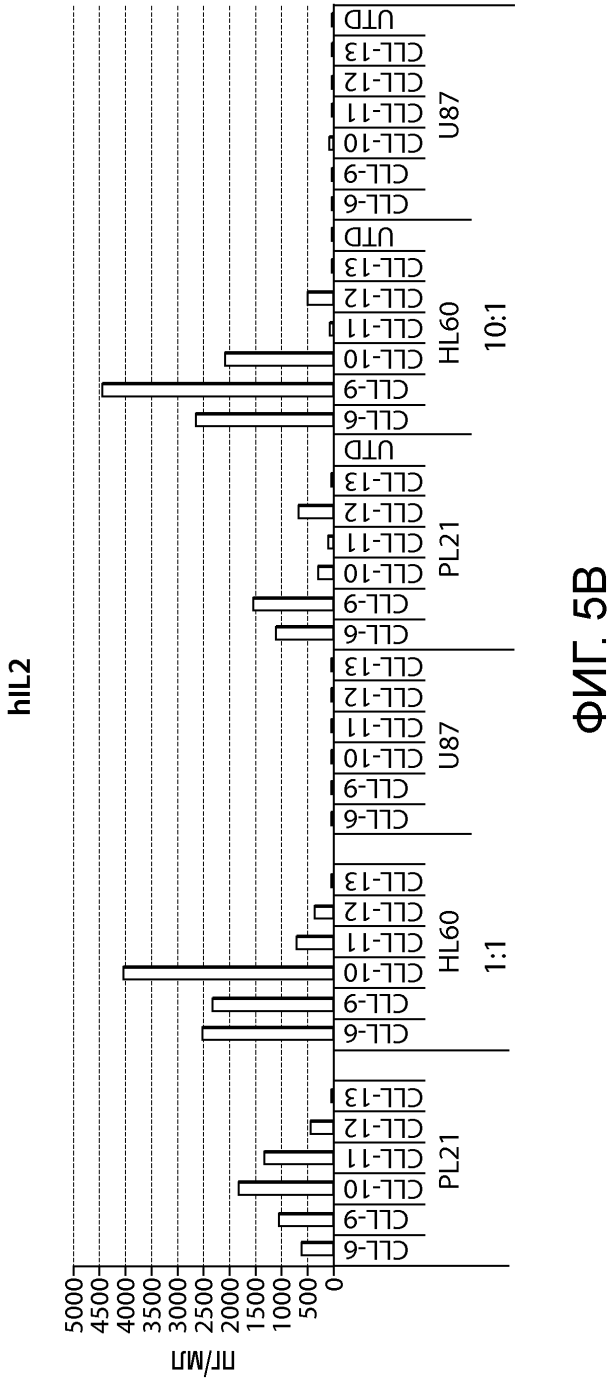


ФИГ. 4С

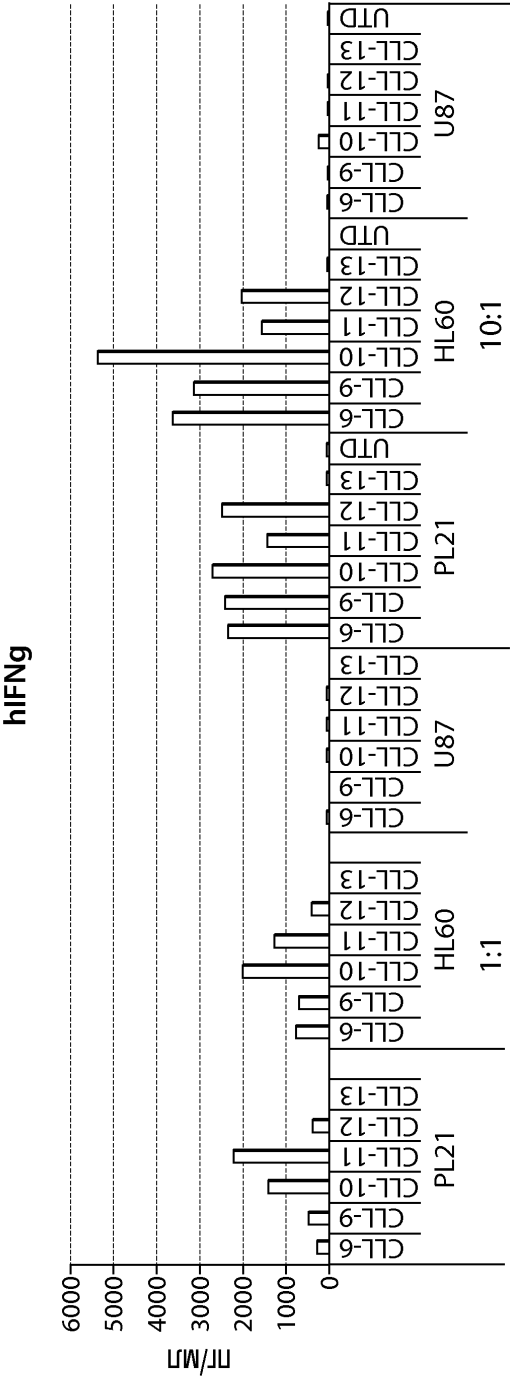
10/56



11/56

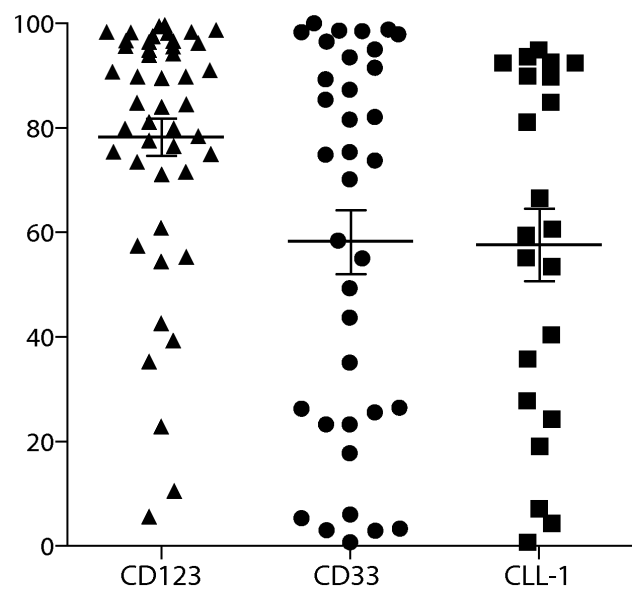


12/56



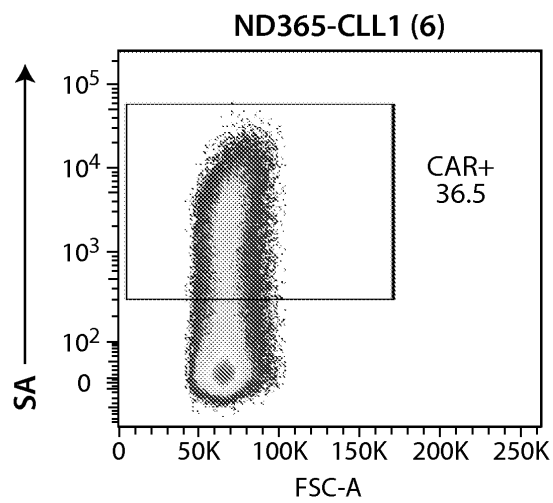
ФИГ. 5C

13/56

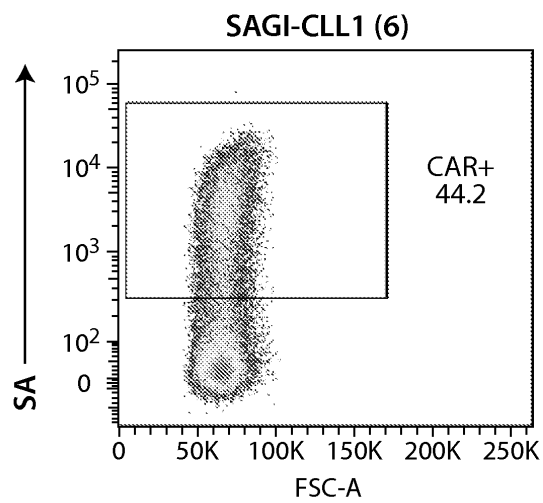


ФИГ. 6

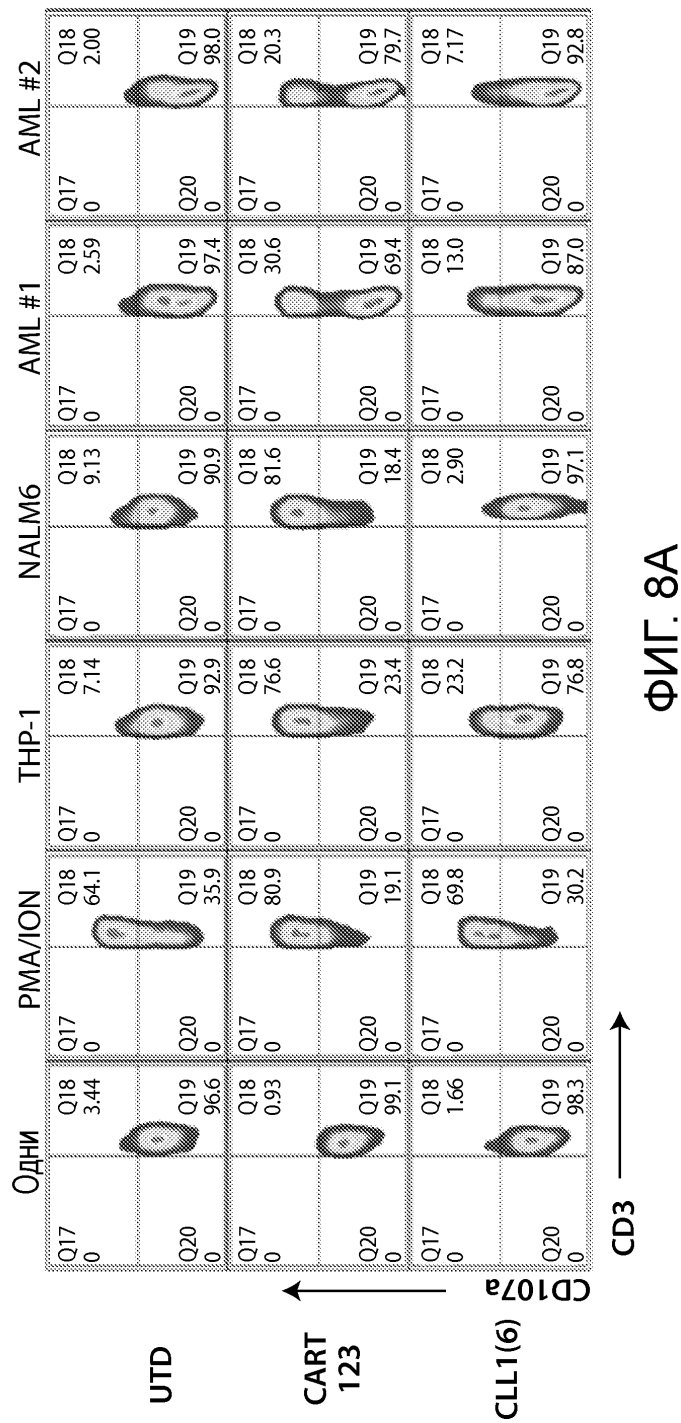
14/56



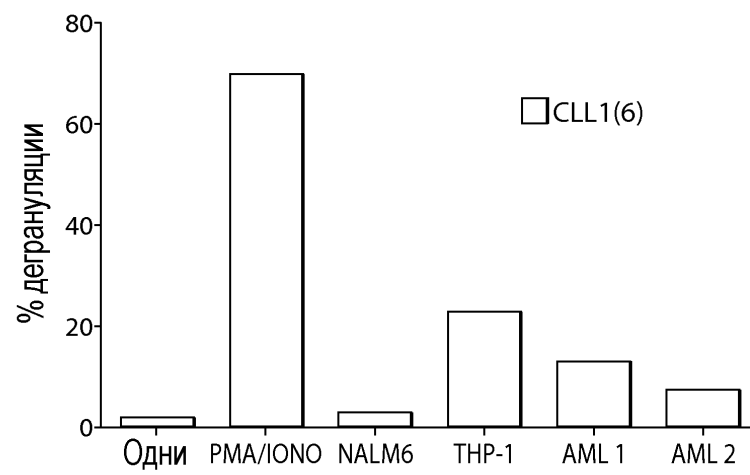
ФИГ. 7А



ФИГ. 7В



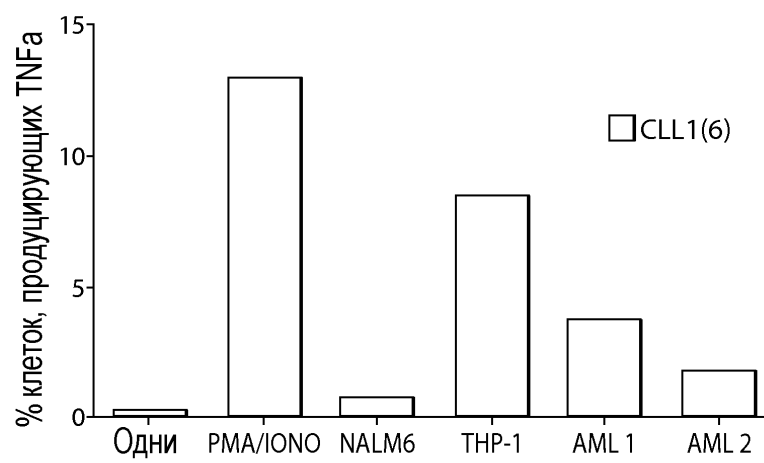
16/56



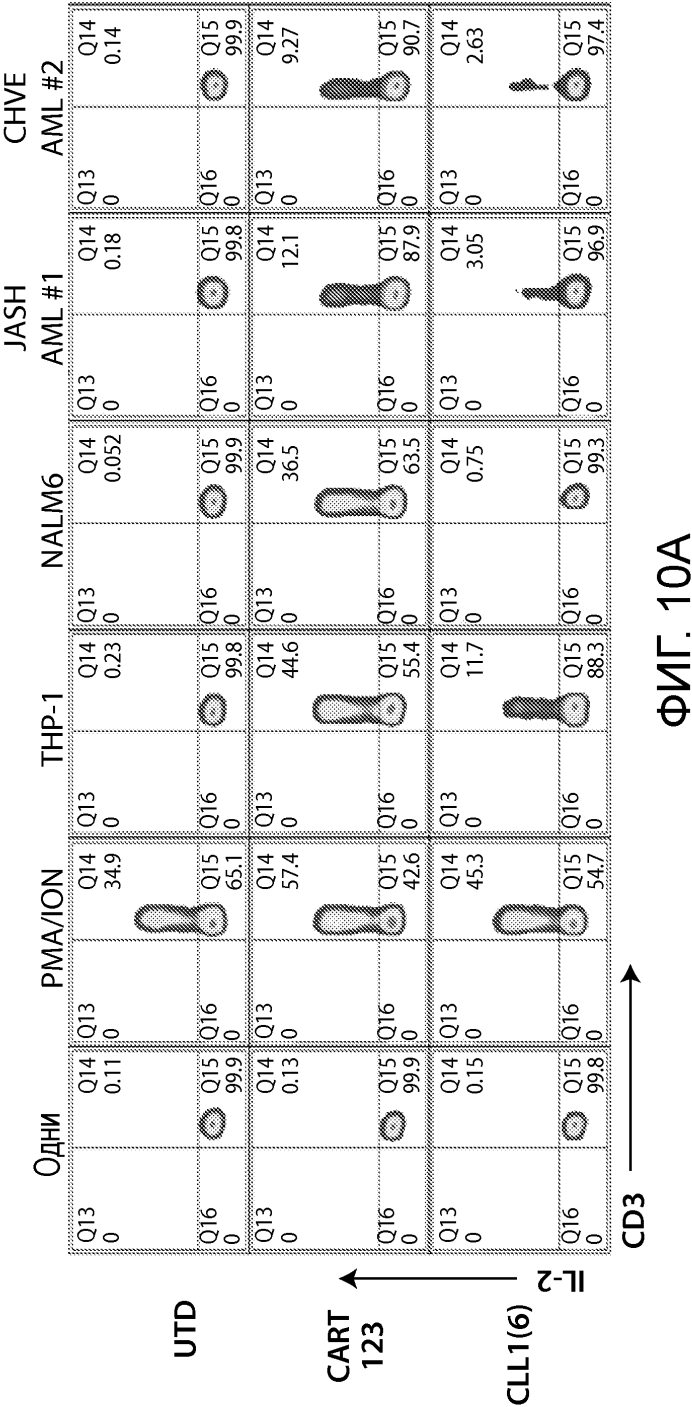
ФИГ. 8В



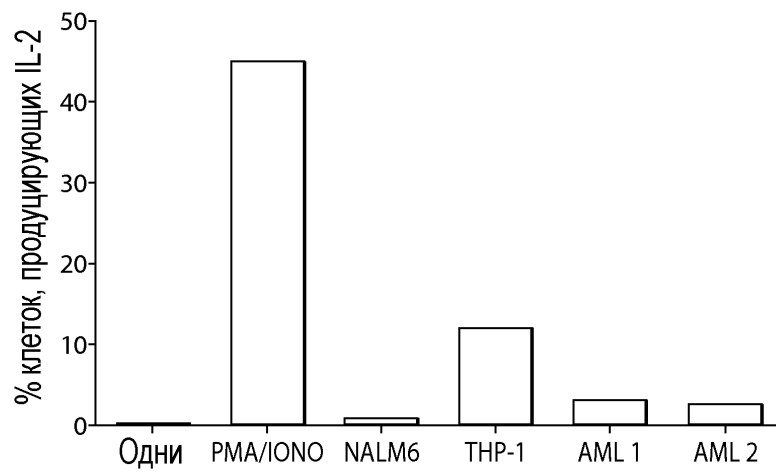
18/56



ФИГ. 9В

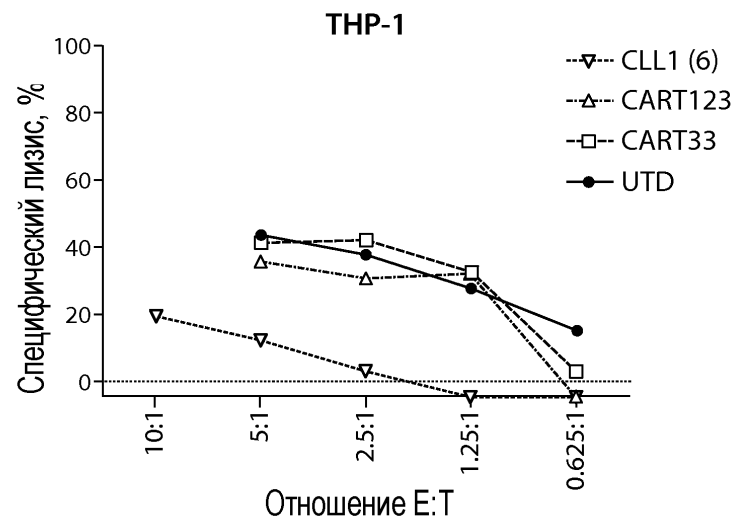


20/56

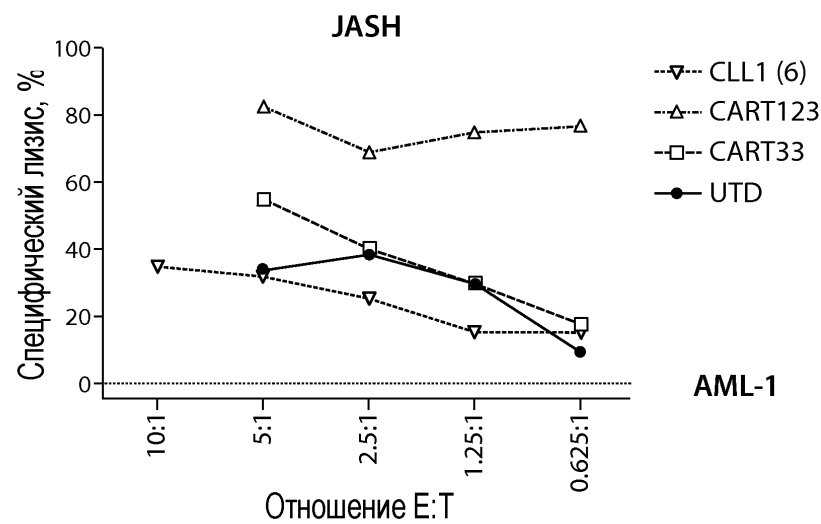


ФИГ. 10В

21/56

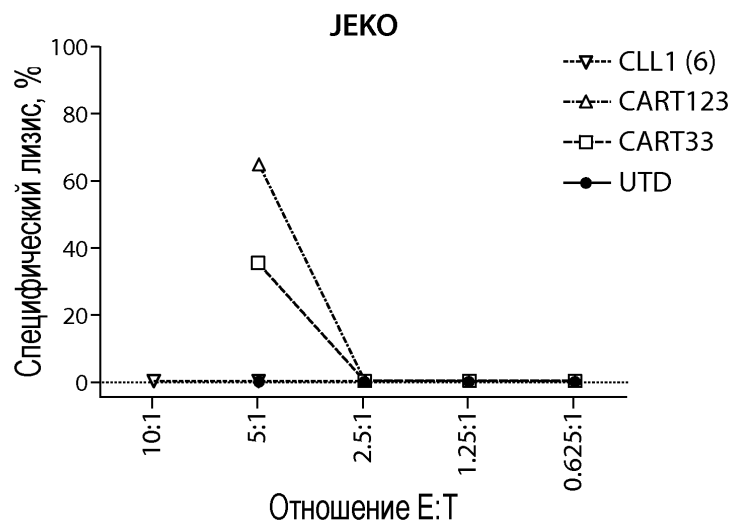


ФИГ. 11А

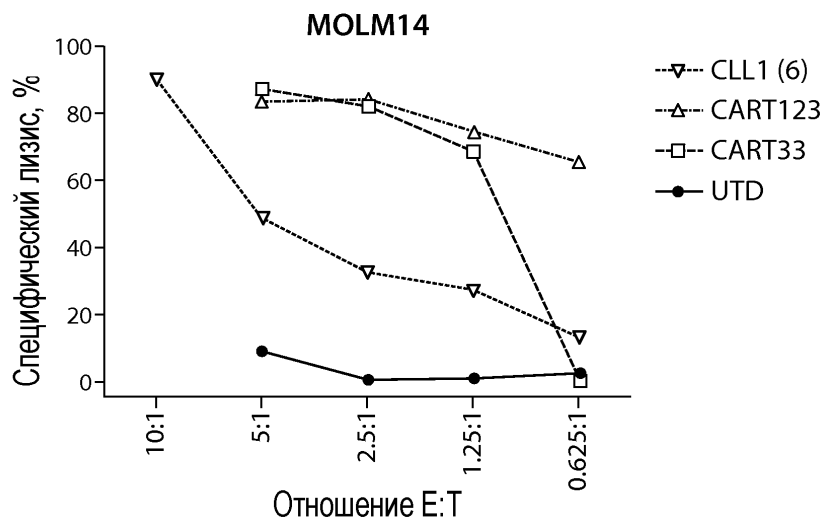


ФИГ. 11В

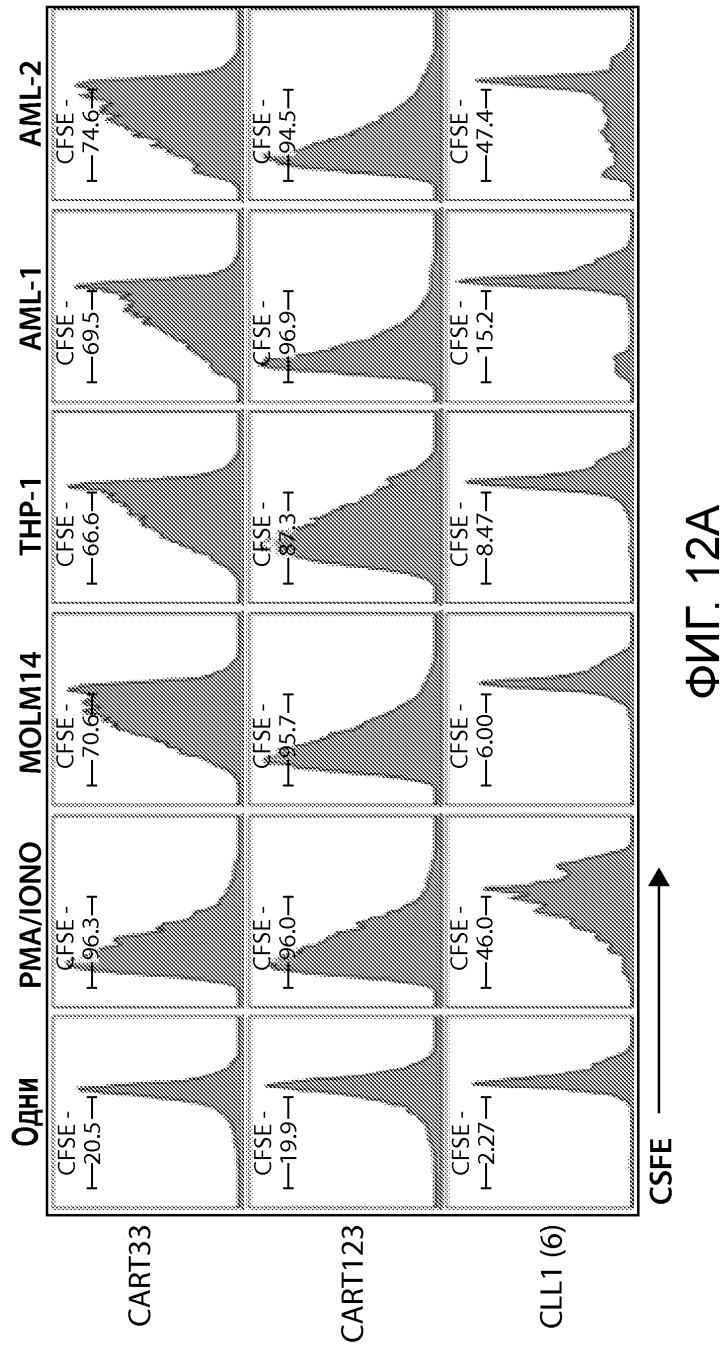
22/56



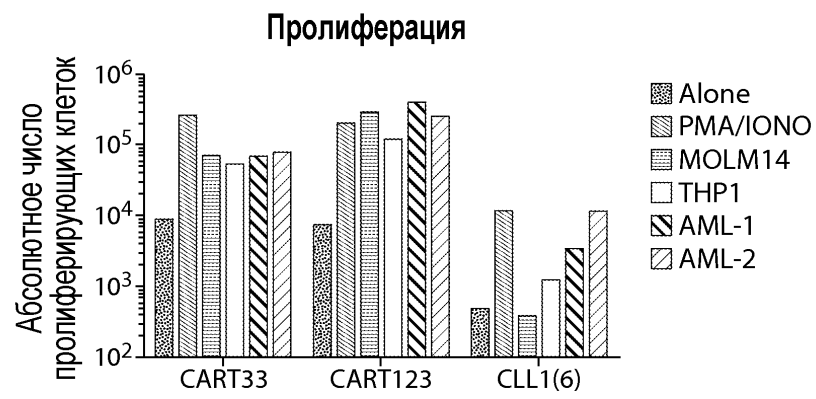
ФИГ. 11С



ФИГ. 11D

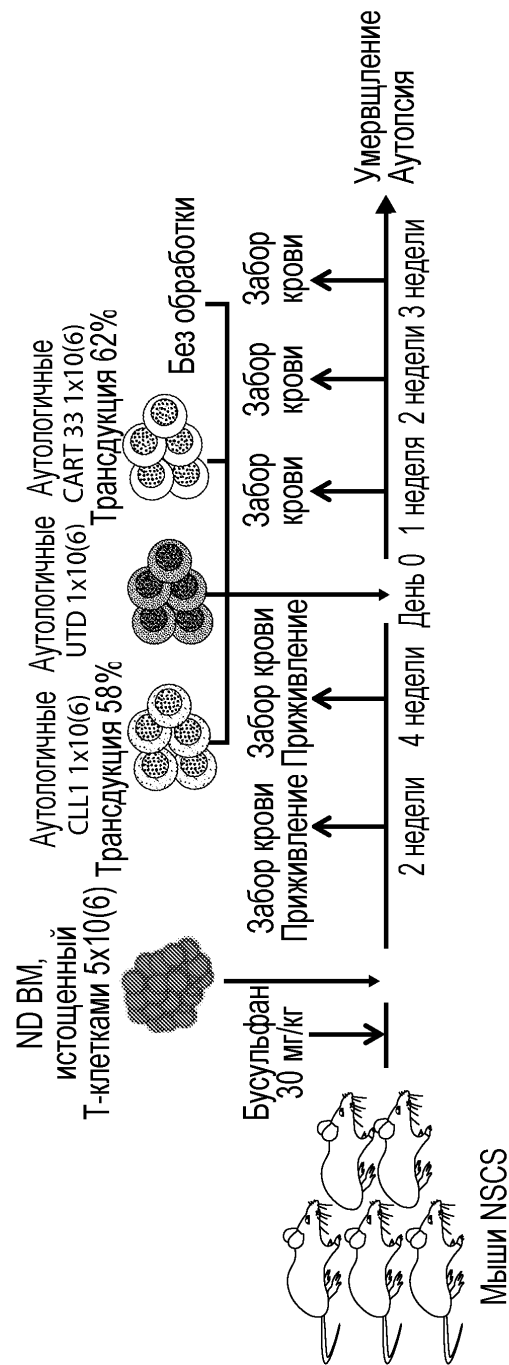


24/56



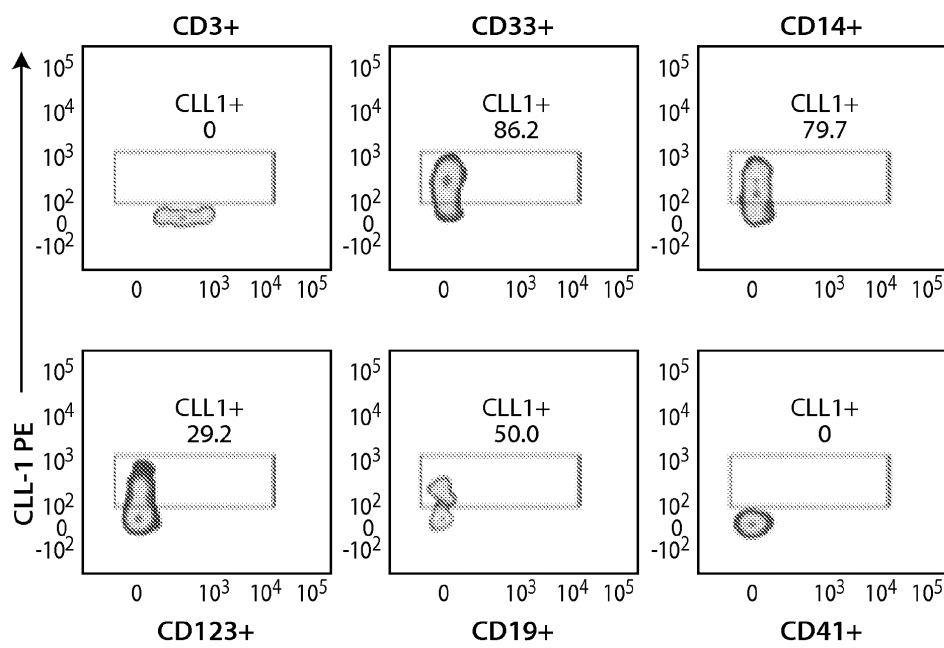
ФИГ. 12В

25/56



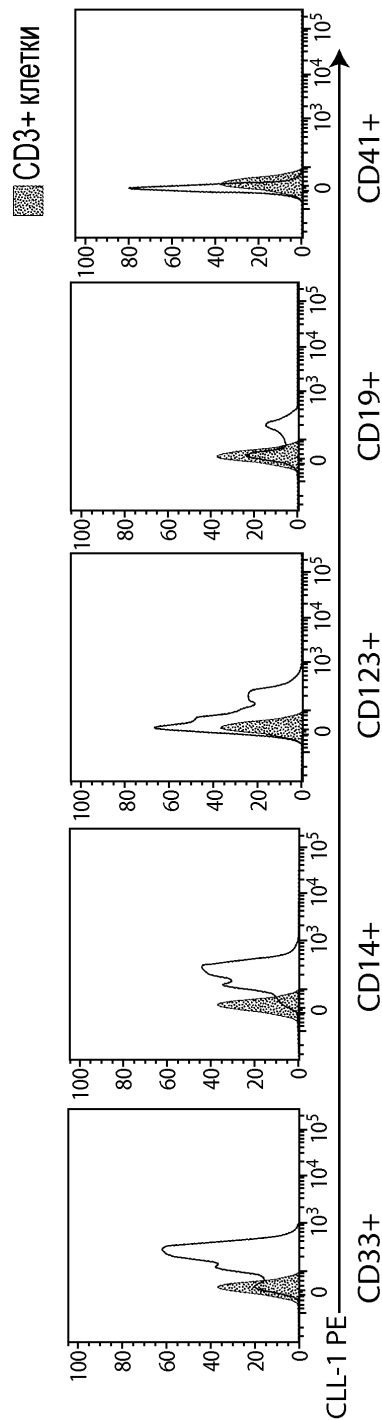
ФИГ. 13

26/56



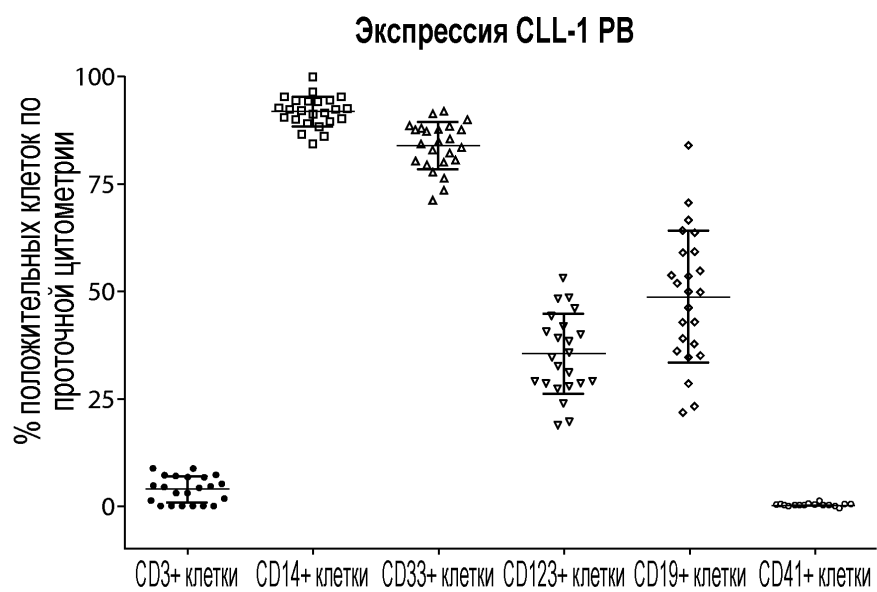
ФИГ. 14А

27/56



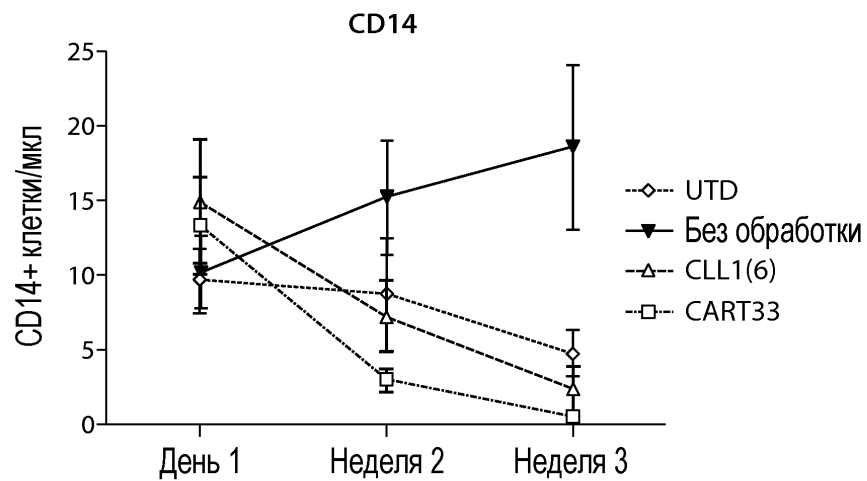
ФИГ. 14В

28/56

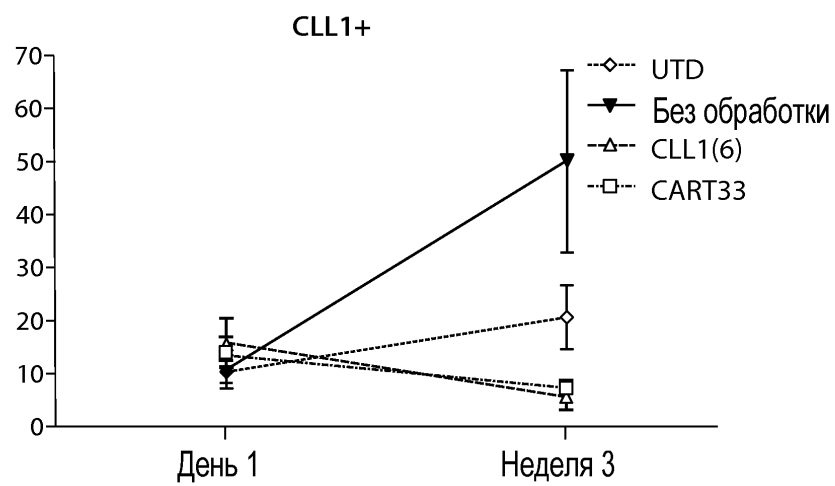


ФИГ. 14С

29/56

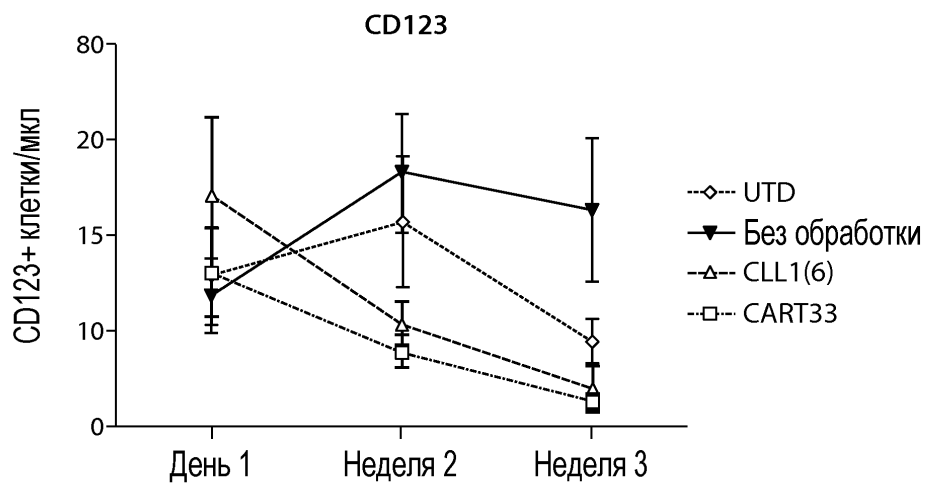


ФИГ. 15А

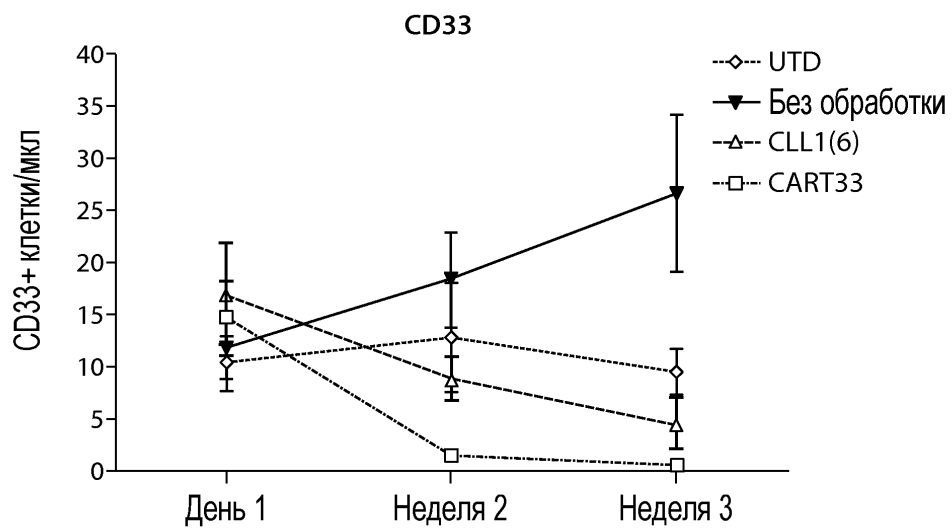


ФИГ. 15В

30/56

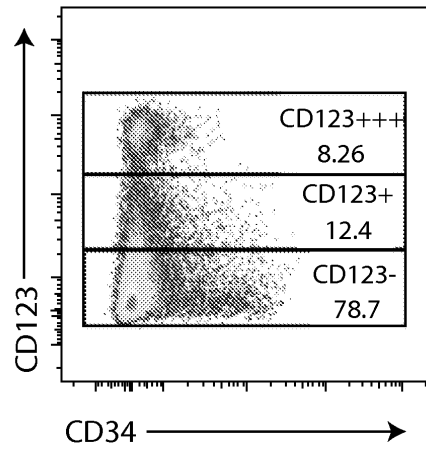


ФИГ. 15С

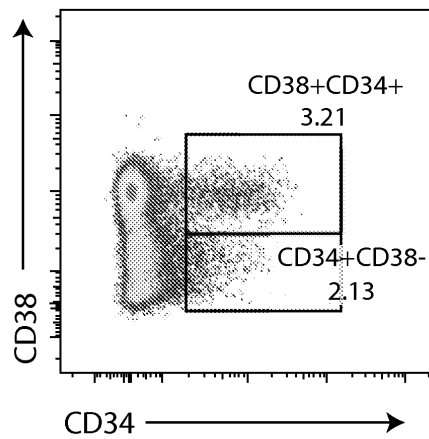


ФИГ. 15D

31/56

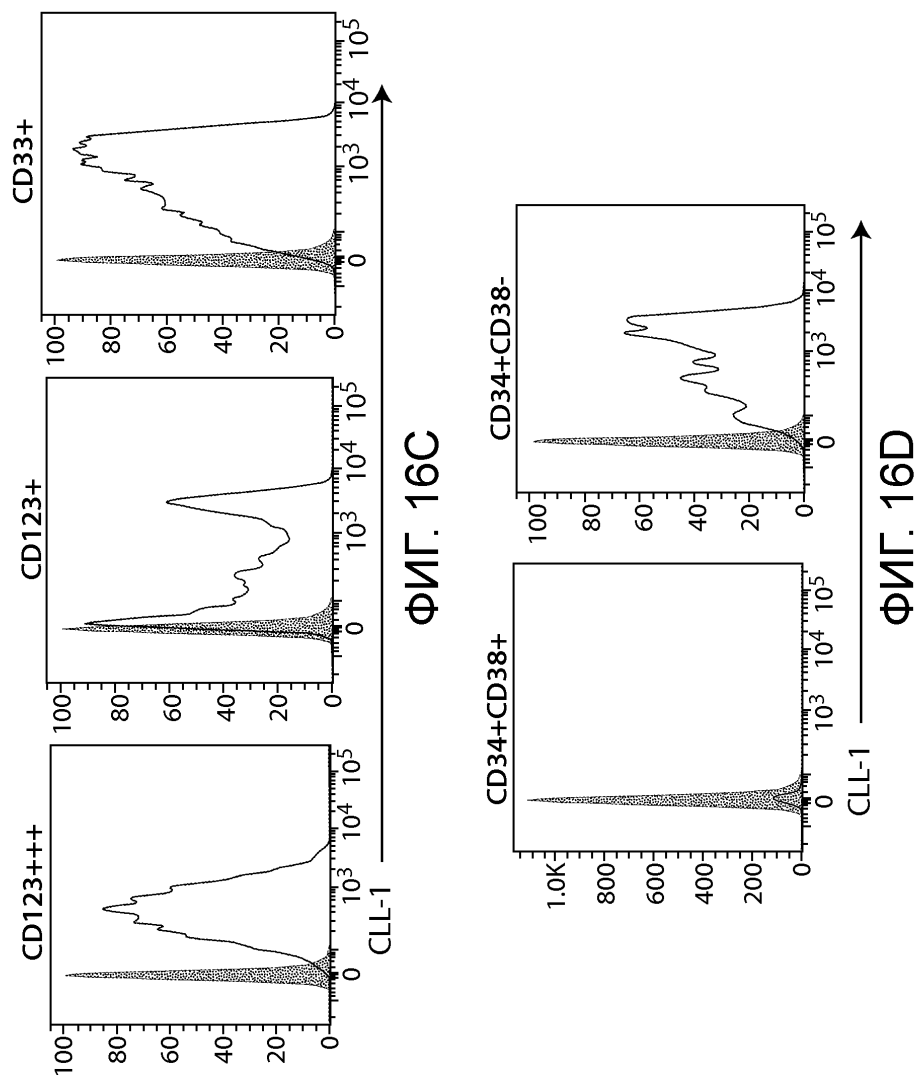


ФИГ. 16А

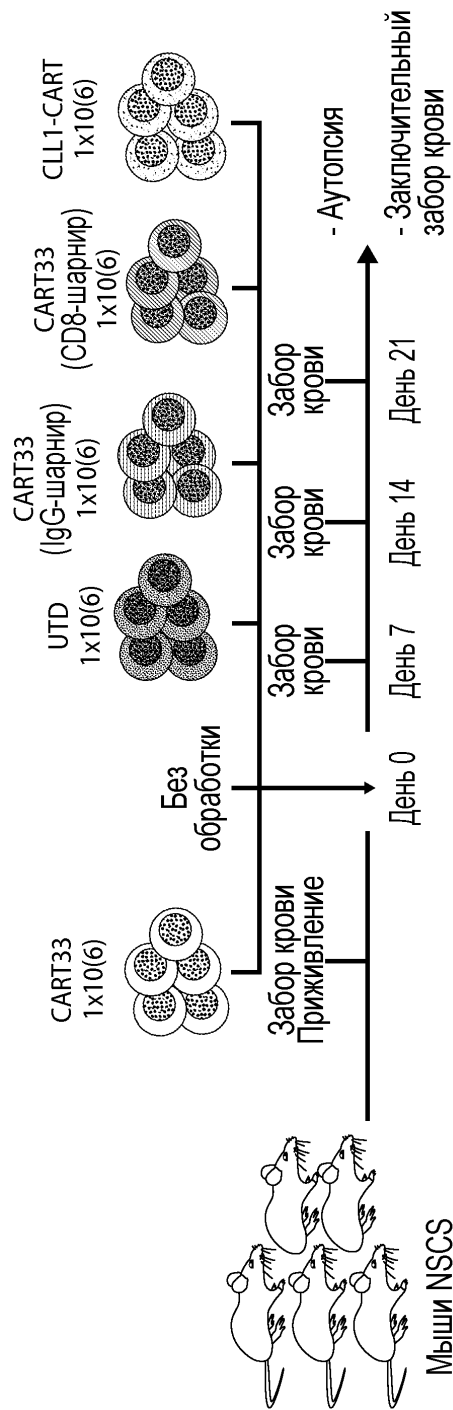


ФИГ. 16В

32/56

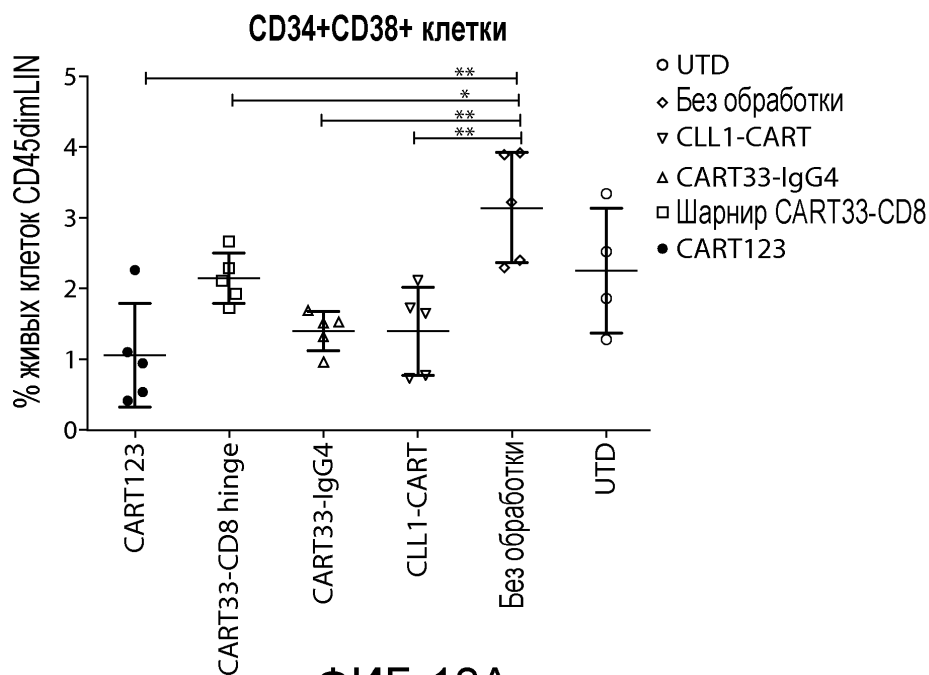


33/56

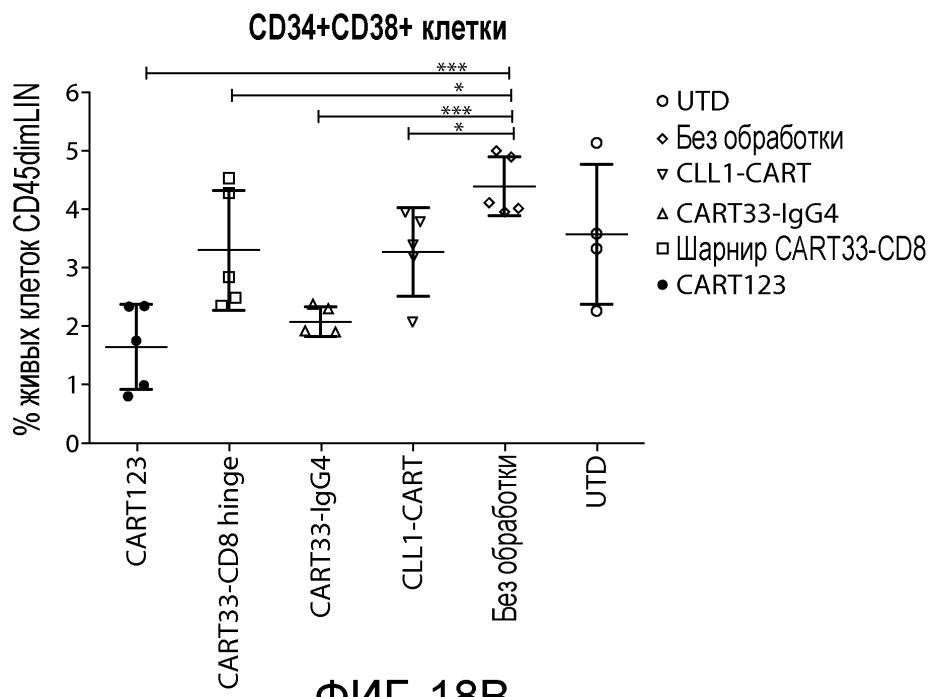


ФИГ. 17

34/56

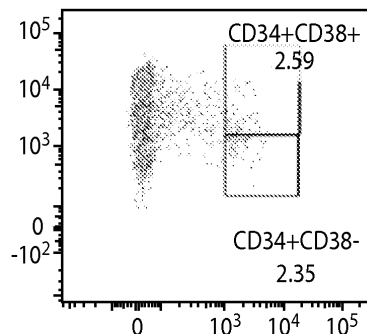


ФИГ. 18А



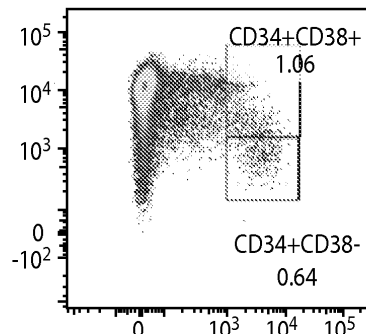
ФИГ. 18В

35/56



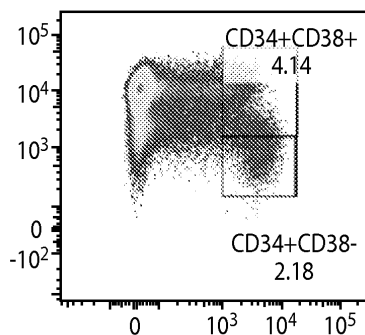
Мыши, обработанные CART33-IgG4

ФИГ. 19А



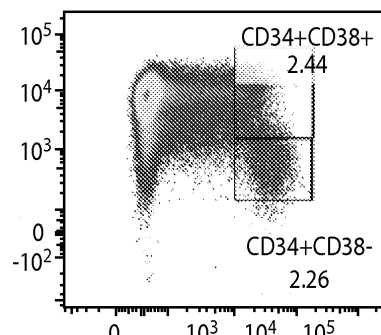
Мыши, обработанные CART123

ФИГ. 19В



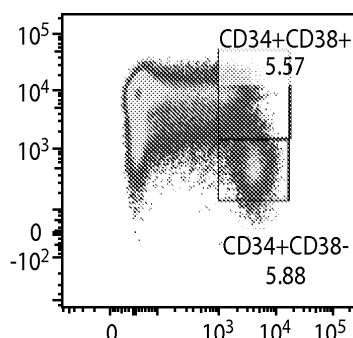
Мыши, обработанные CLL-1 CART

ФИГ. 19С



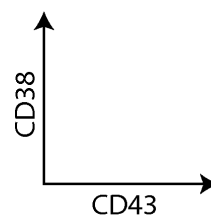
Мыши, обработанные CART33-CD8

ФИГ. 19D

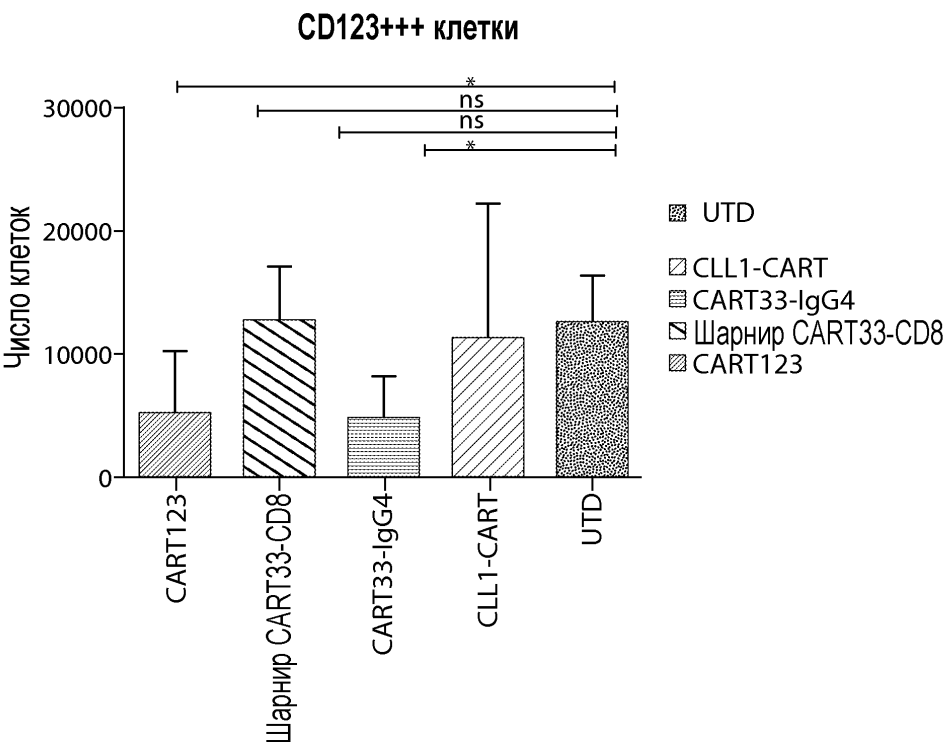


Мыши без обработки

ФИГ. 19Е

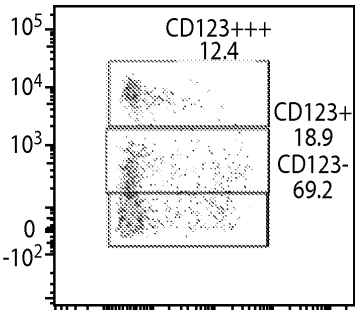


36/56



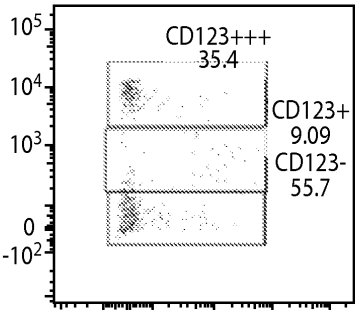
ФИГ. 20

37/56



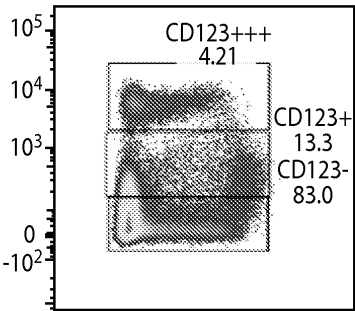
Мыши, обработанные CART33-IgG4

ФИГ. 21A



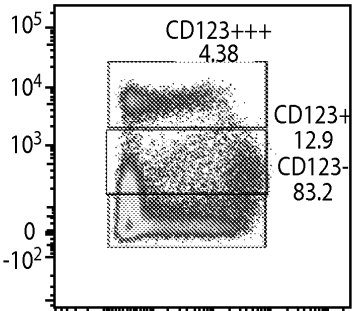
Мыши, обработанные CART123

ФИГ. 21B



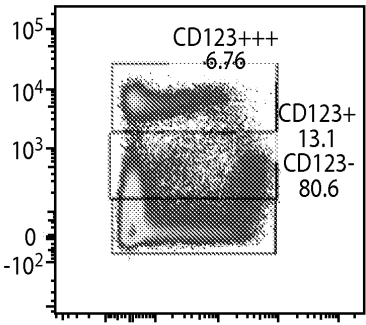
Мыши, обработанные CLL-1 CART

ФИГ. 21C



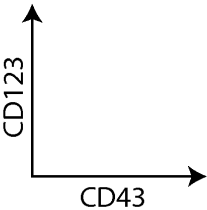
Мыши, обработанные CART33-CD8

ФИГ. 21D

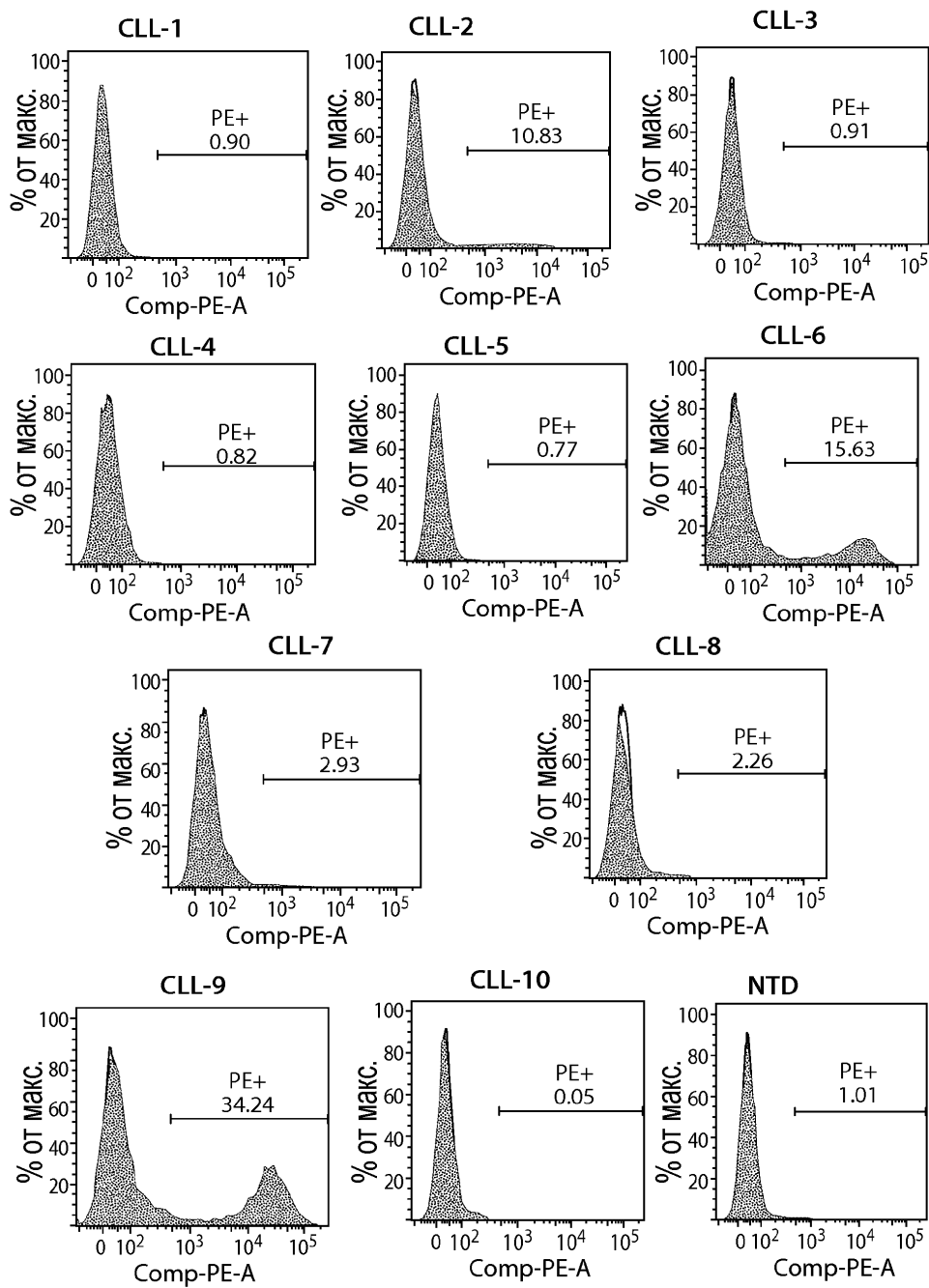


Мыши без обработки

ФИГ. 21E

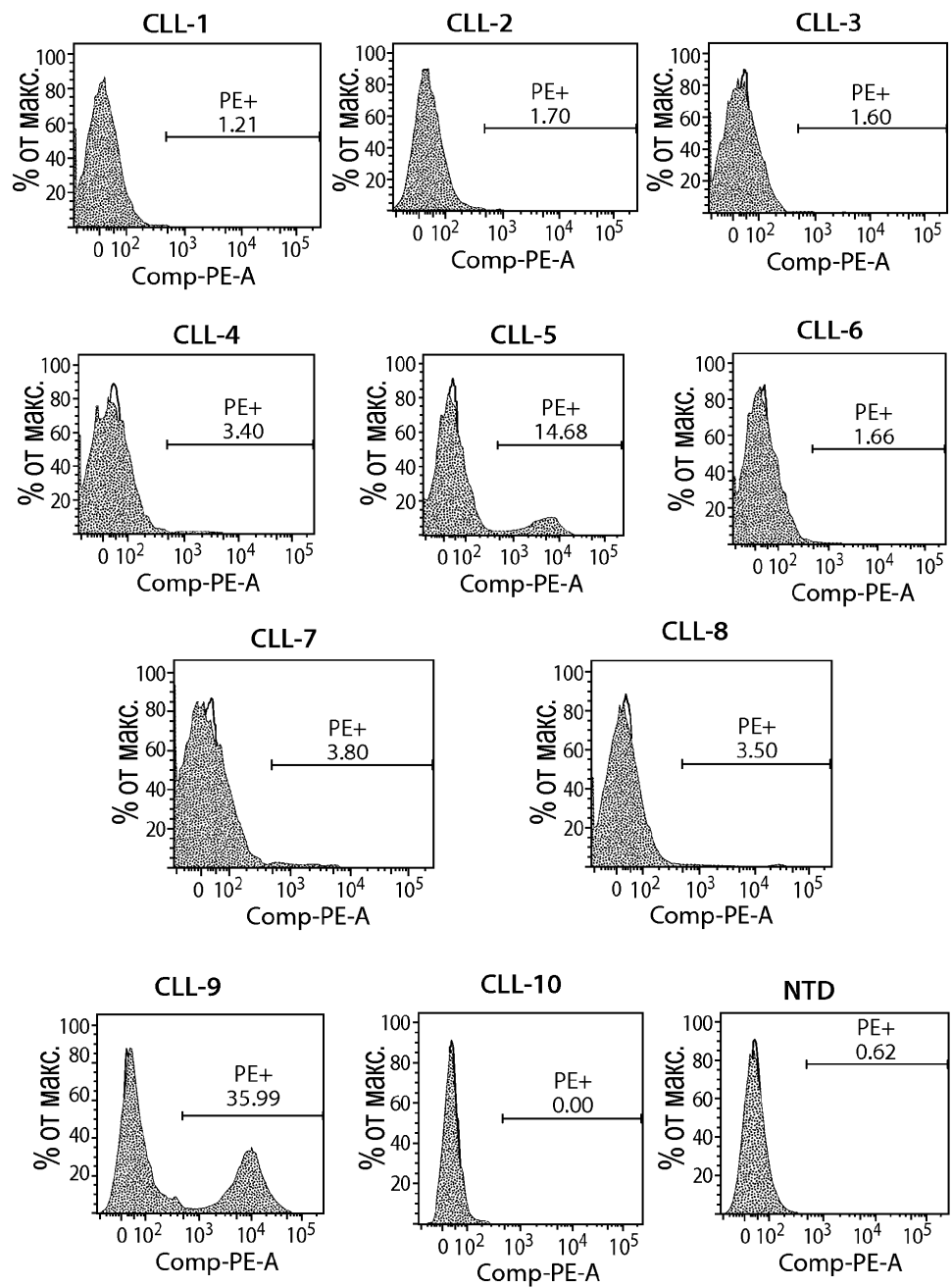


38/56



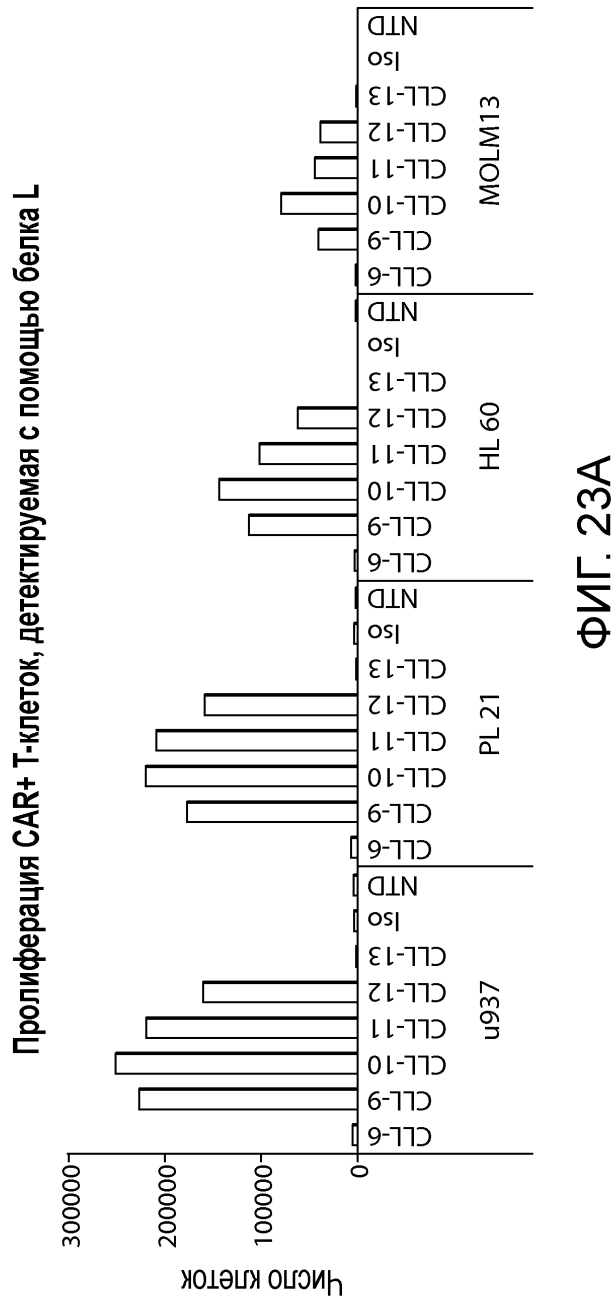
ФИГ. 22А

39/56

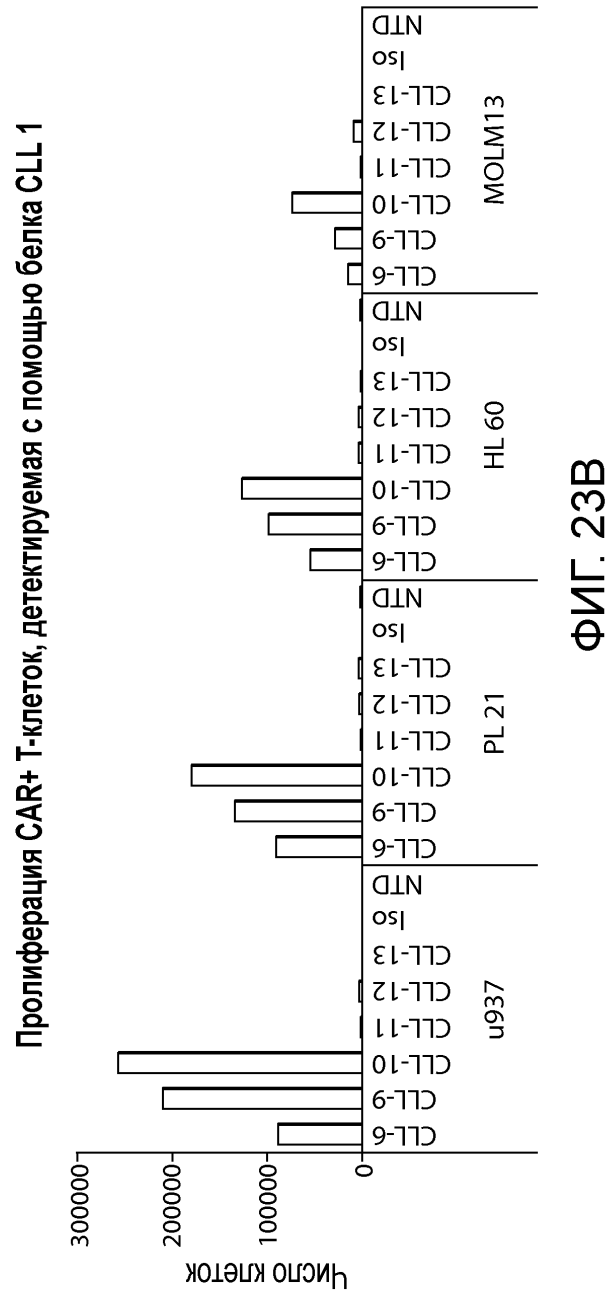


ФИГ. 22В

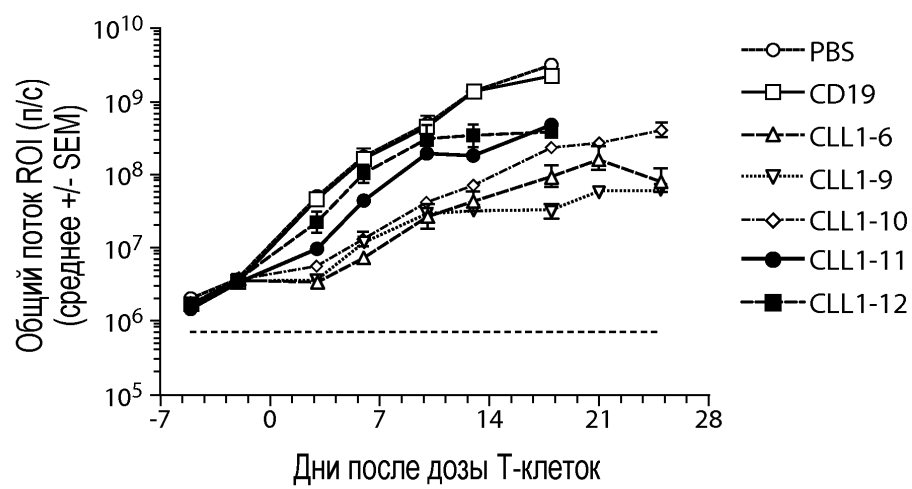
40/56



41/56

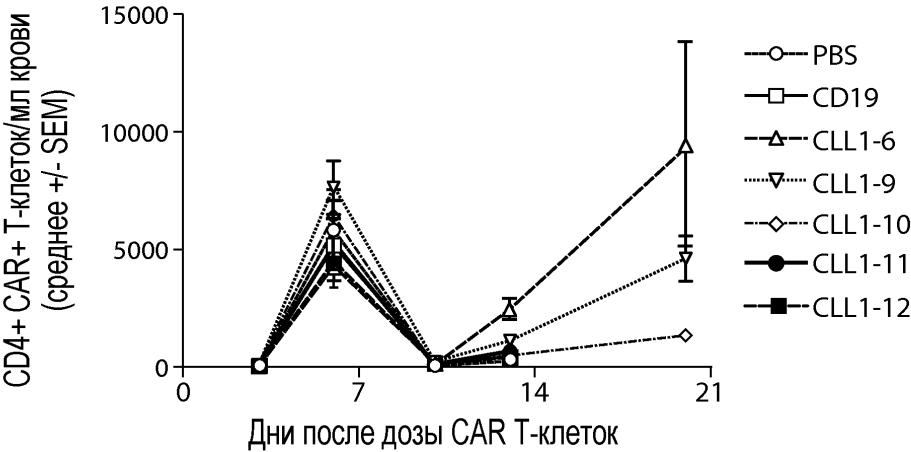


42/56

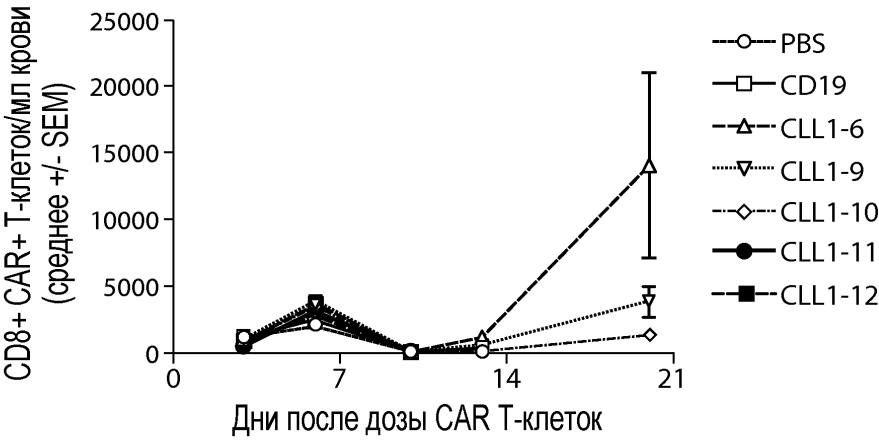


ФИГ. 24

43/56

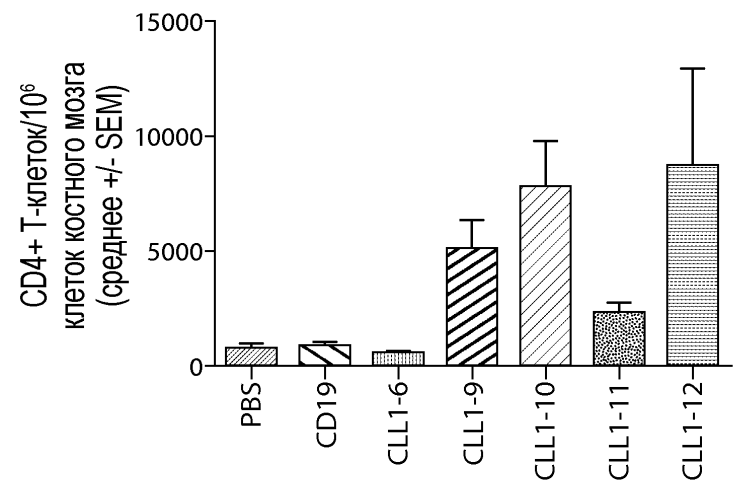


ФИГ. 25А

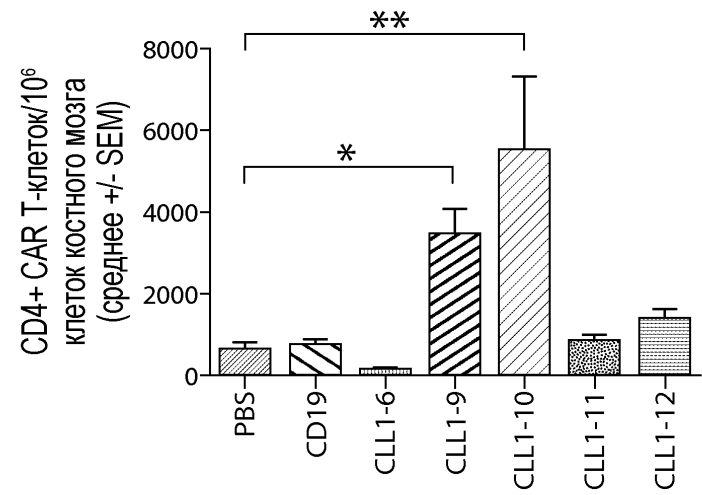


ФИГ. 25В

44/56

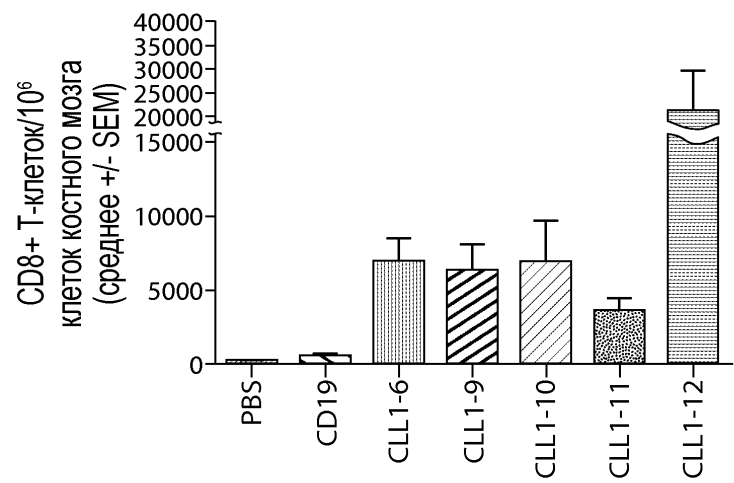


ФИГ. 26А

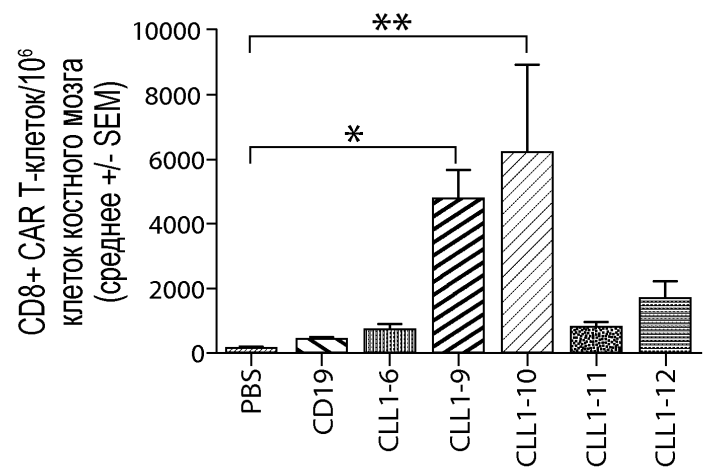


ФИГ. 26В

45/56

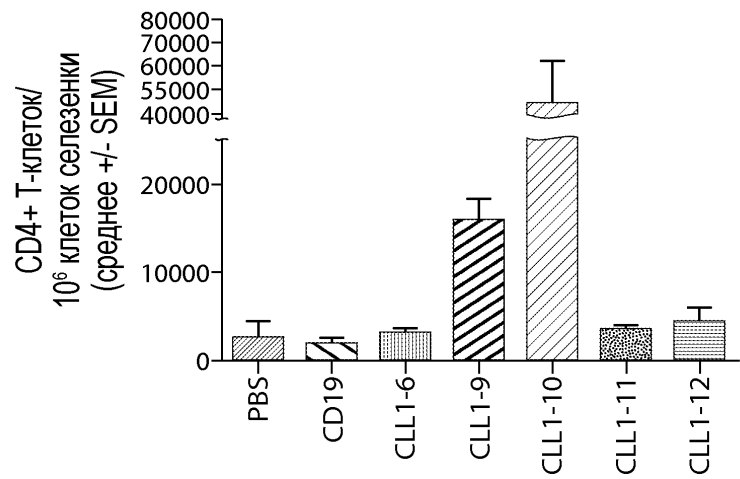


ФИГ. 26С

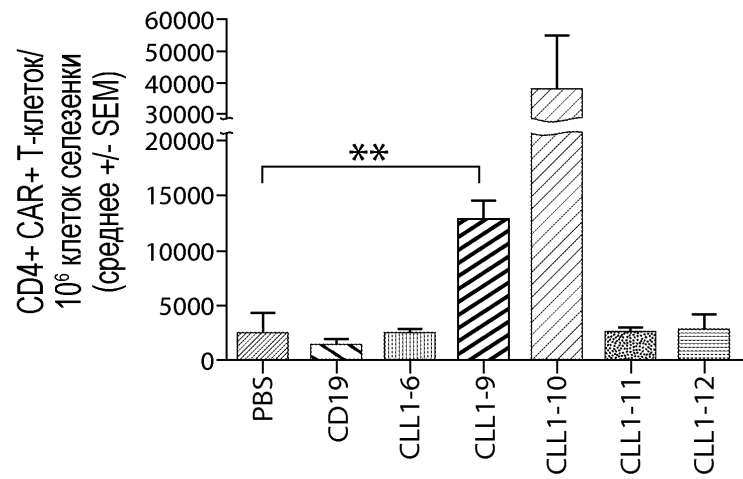


ФИГ. 26D

46/56

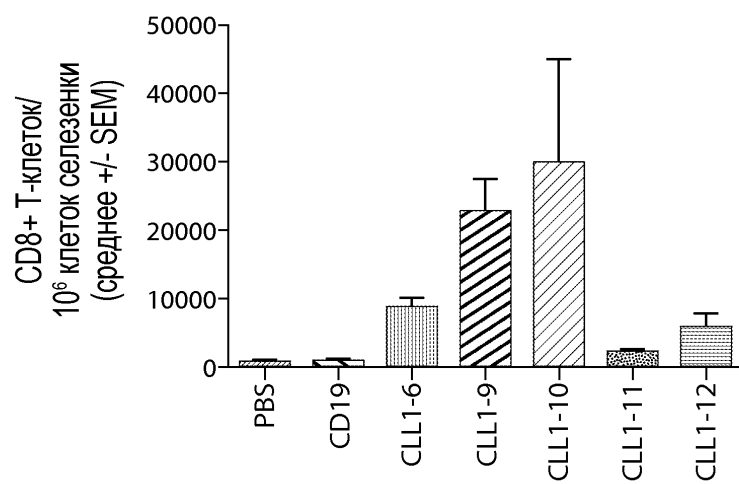


ФИГ. 27А

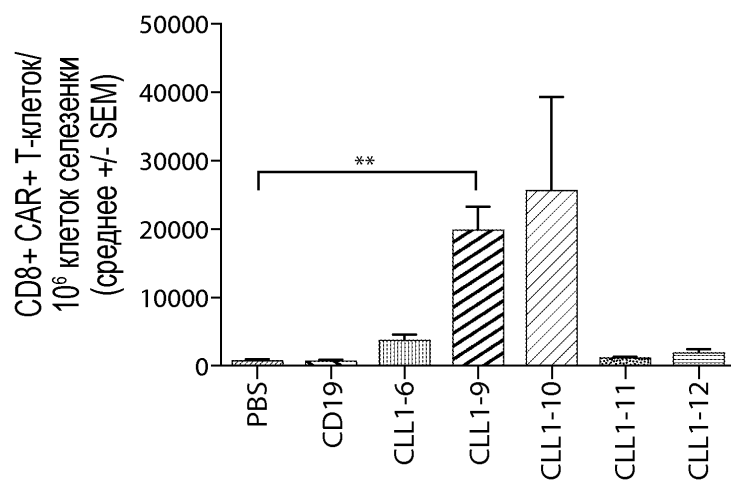


ФИГ. 27В

47/56

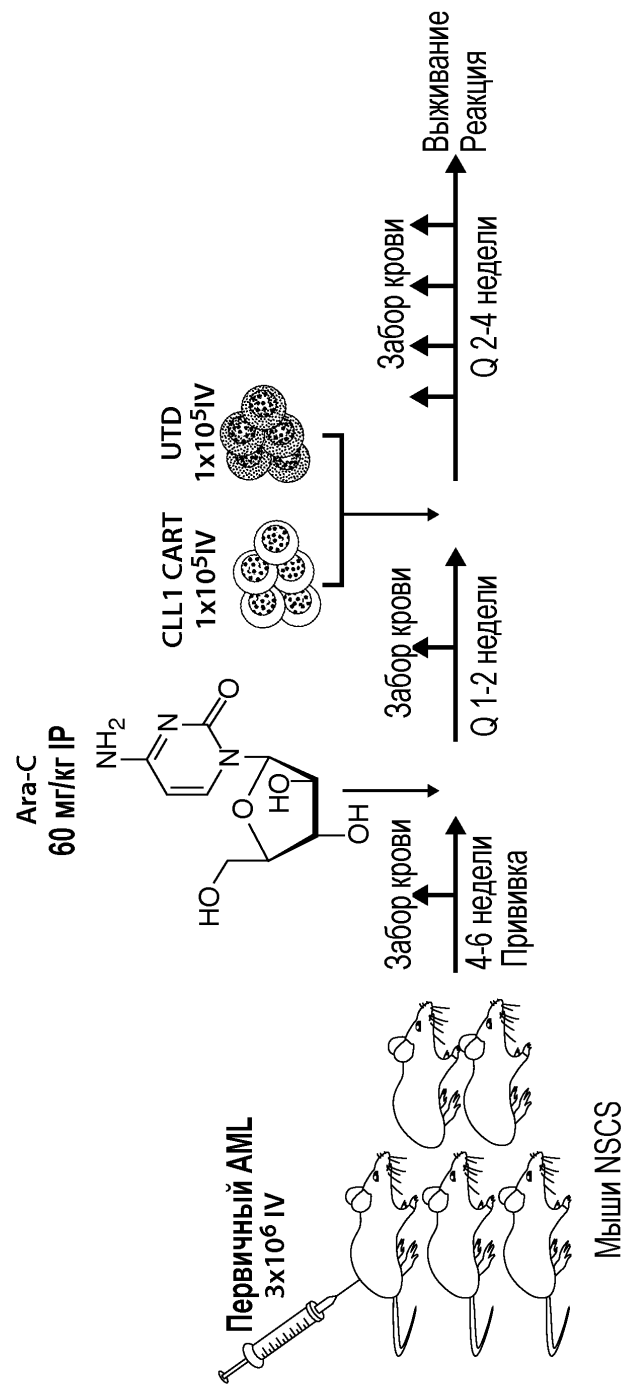


ФИГ. 27С



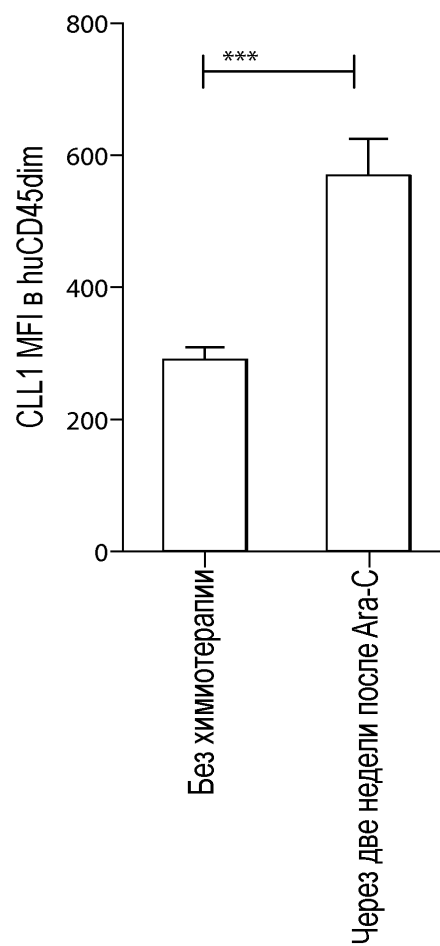
ФИГ. 27D

48/56



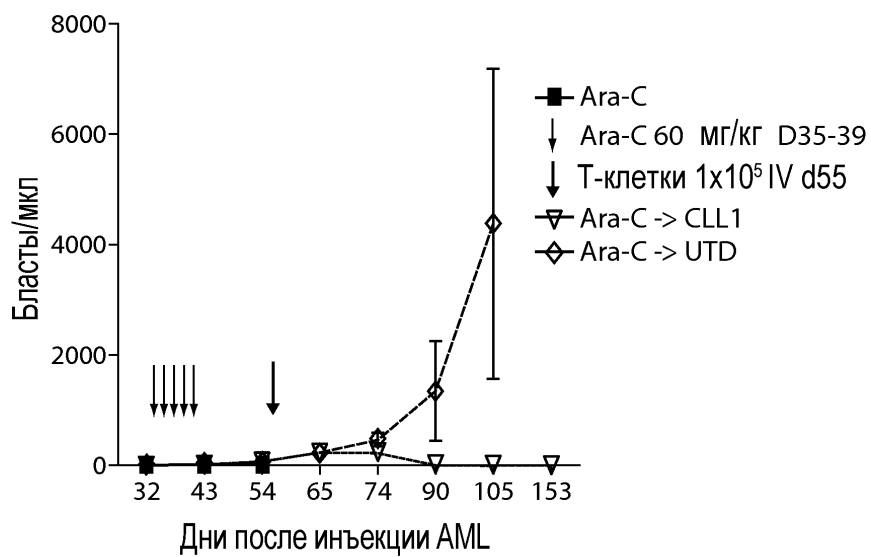
ФИГ. 28А

49/56



ФИГ. 28В

50/56

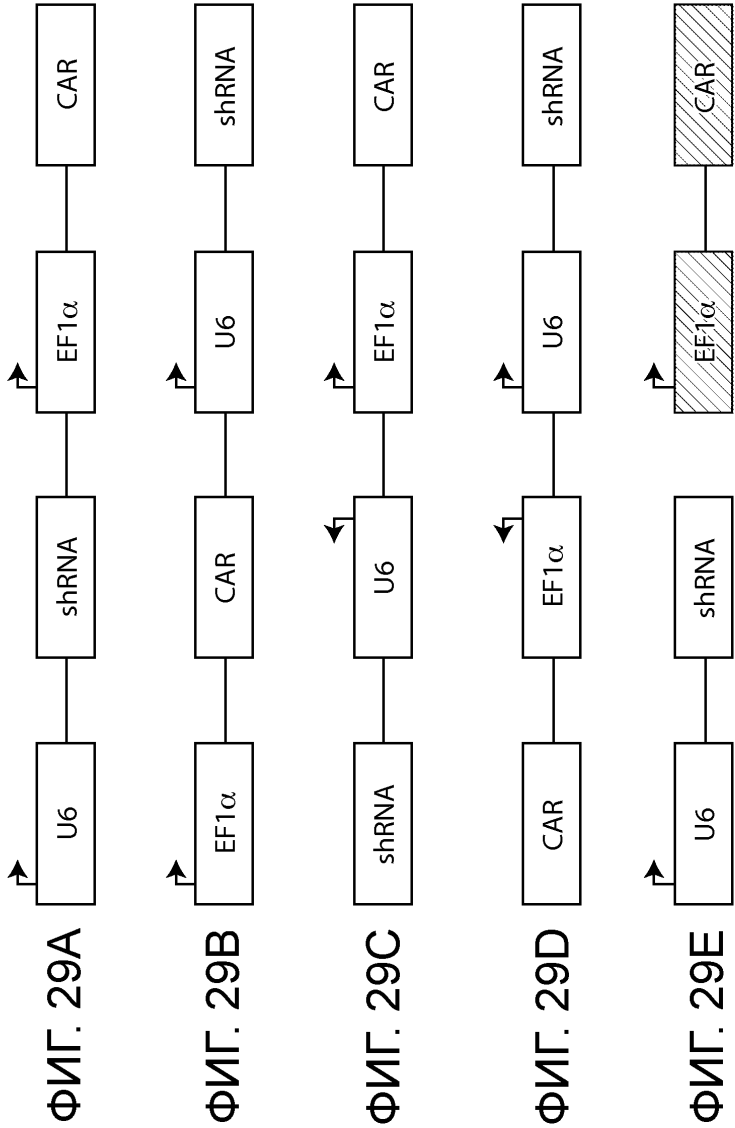


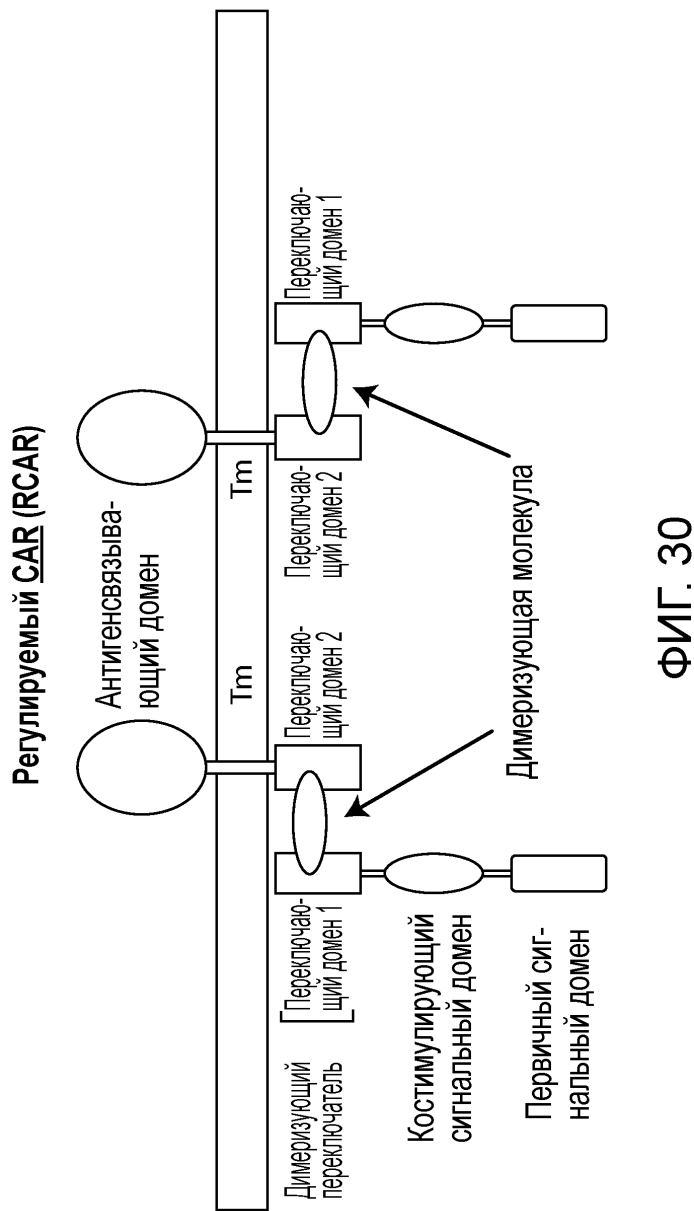
ФИГ. 28С



ФИГ. 28D

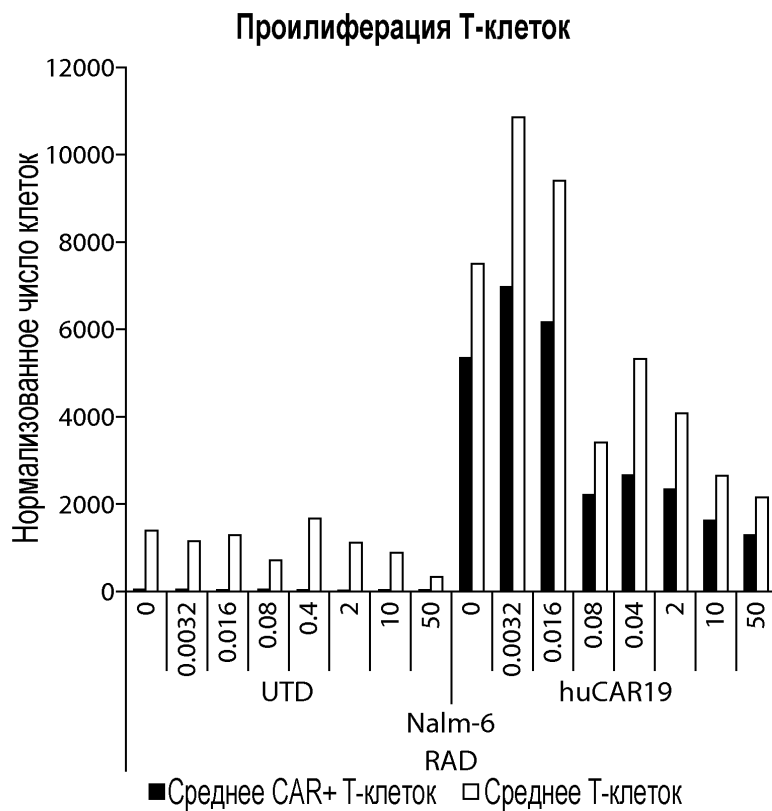
Векторные конструкции





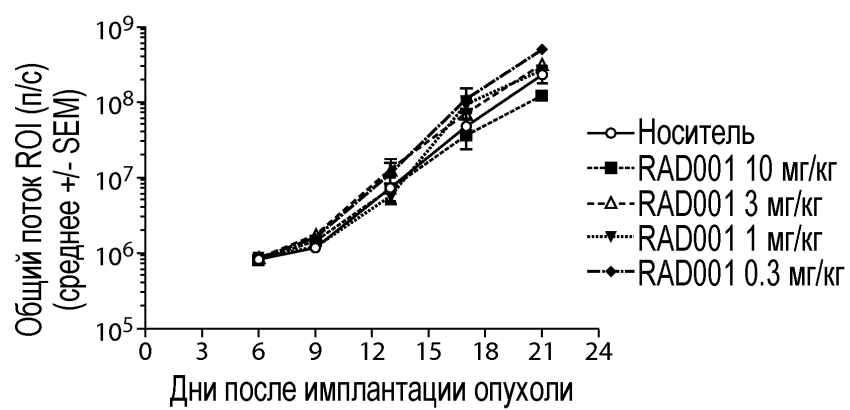
ФИГ. 30

53/56



ФИГ. 31

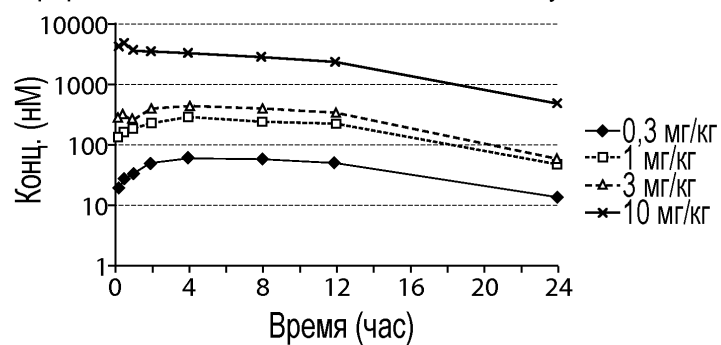
54/56



ФИГ. 32

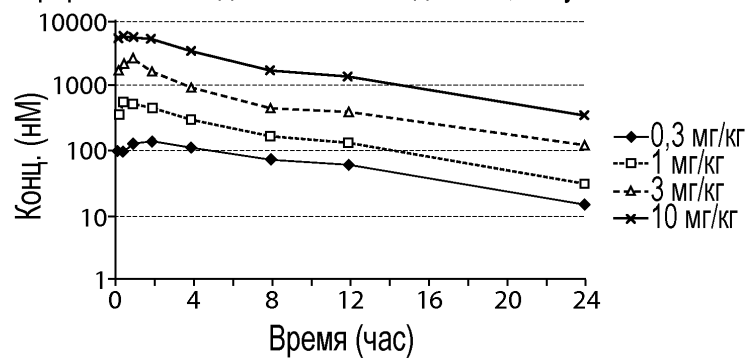
55/56

Пероральное введение RAD001: день 0, РК у мыши NSG



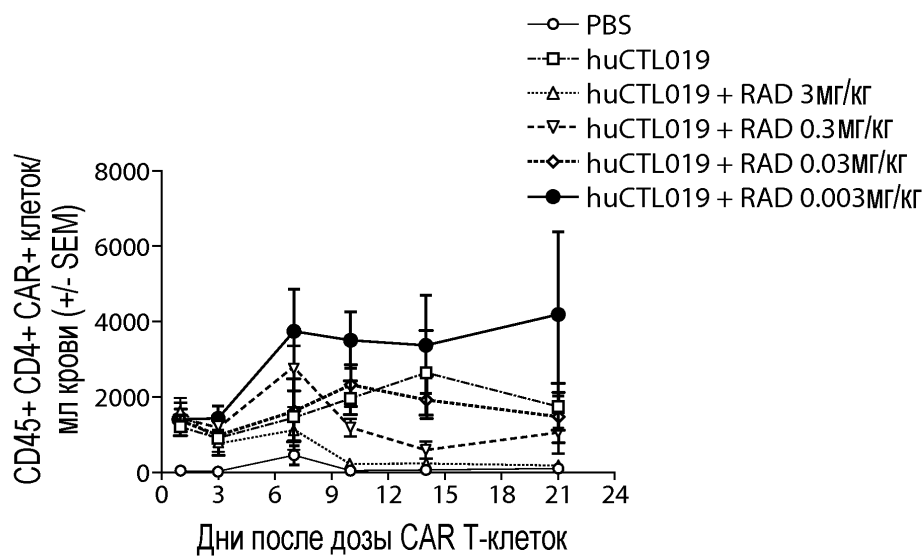
ФИГ. 33А

Пероральное введение RAD001: день 14, РК у мыши NSG

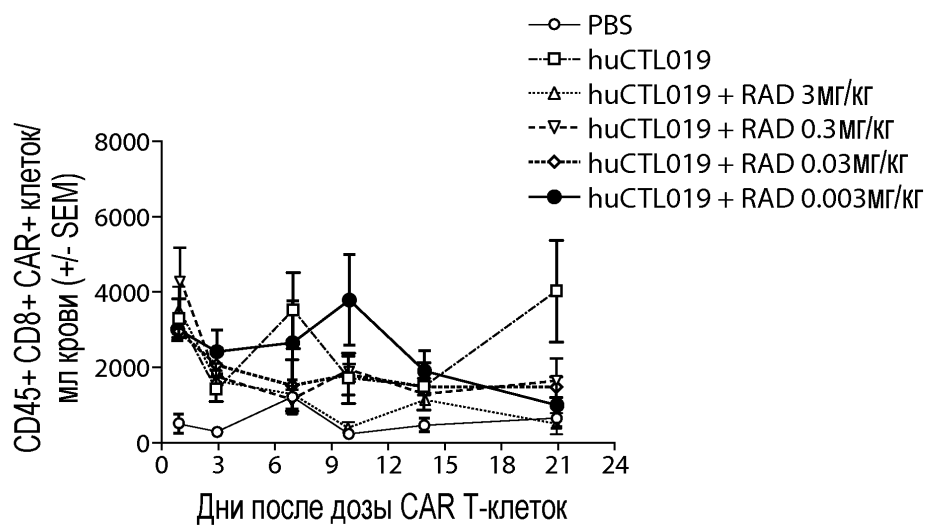


ФИГ. 33В

56/56



ФИГ. 34А



ФИГ. 34В