

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090839

(13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.02.04

(51) Int. Cl. *A61K 35/17* (2015.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C12N 5/06 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.09.27

(54) НОВЫЕ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ КОСТИМУЛЯЦИИ, НОВЫЕ КОНСТРУКЦИИ CAR И ДРУГИЕ УЛУЧШЕНИЯ ДЛЯ АДАПТИВНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

(31) 62/564,249

(72) Изобретатель:
Чаудхари Прит М. (US)

(32) 2017.09.27

(33) US

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

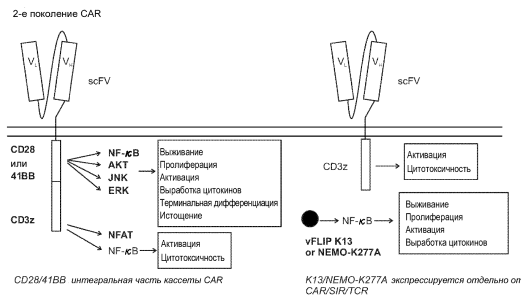
(86) PCT/US2018/053247

(87) WO 2019/067805 2019.04.04

(71) Заявитель:

ЮНИВЕРСИТИ ОФ САУТЕРН
КАЛИФОРНИЯ (US)

(57) Изобретение предоставляет композиции и способ, которые способствуют адаптивной клеточной терапии. Данное изобретение предоставляет полинуклеотиды, векторы, системы и клетки, содержащие химерные антигенные рецепторы (CAR), синтетические иммунные рецепторы (SIR) и т.п., в сочетании со специфическими активаторами активности NF-κB, таким образом, улучшая клеточную пролиферацию, экспрессию и снижая апоптоз, что улучшает персистенцию клеток при адаптивной клеточной терапии.



202090839

A1

A1

202090839

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-562644EA/018

НОВЫЕ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ КОСТИМУЛЯЦИИ, НОВЫЕ КОНСТРУКЦИИ CAR И ДРУГИЕ УЛУЧШЕНИЯ ДЛЯ АДАПТИВНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка заявляет приоритет согласно §119 раздела 35 Кодекса законов США по предварительной заявке США, № 62/564249, поданной 27 сентября 2017 года, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] В данном документе представлены новый костимуляторный модуль и новые химерные антигенные рецепторы для адаптивной клеточной терапии рака, инфекций, аллергических, дегенеративных и иммунных расстройств.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0003] Сопровождает данную подачу Перечень последовательностей имеющий название «Sequence_ST25.txt», созданный 27 сентября 2018 года и имеющий 60347260 байта данных, машинно отформатированный на IBM-PC в операционной системе MS-Windows. Указанный Перечень последовательностей включен в данное описание в качестве ссылки во всей своей полноте для всех целей.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Адаптивная Т-клеточная иммунотерапия вышла на передний план в подходах к лечению рака. Т клетки могут быть сконструированы для экспрессии генов химерных антигенных рецепторов (CAR - chimeric antigen receptors), которые распознают антигены, ассоциированные с опухолью. CAR - это сконструированные иммунорецепторы, которые могут перенаправлять Т клетки, чтобы избирательно уничтожать опухолевые клетки. Общая предпосылка для их использования в иммунотерапии рака заключается в том, чтобы быстро генерировать Т-клетки, нацеленные на опухоль, обходя барьеры и возрастающую кинетику активной иммунизации и, таким образом, действовать как «живые лекарства». В отличие от физиологического Т-клеточного рецептора (TCR), который связывает HLA-пептидные комплексы, CAR взаимодействуют с молекулами, которые не требуют распознавания пептида или экспрессии HLA. Таким образом, CAR, в отличие от TCR, распознают антиген на любом фоне HLA, который необходимо сопоставить с гаплотипом пациента. Кроме того, CAR могут нацеливаться на опухолевые клетки, которые имеют пониженную экспрессию HLA или протеасомный процессинг антигена, два механизма, которые способствуют избеганию опухоли TCR-опосредованного иммунитета. Еще одной особенностью широкой применимости CAR является их способность связываться не только с белками, но также с углеводными и гликолипидными структурами, что также расширяет диапазон потенциальных мишеней.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Данное раскрытие обеспечивает иммунную клетку или популяции иммунных клеток, экспрессирующие (i) по меньшей мере один не встречающийся в природе иммунный рецептор и (ii) по меньшей мере один не встречающийся в природе агент, который селективно активирует сигнальный путь NF- κ B. В одном варианте осуществления по меньшей мере один не встречающийся в природе иммунный рецептор содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий домен и по меньшей мере один трансмембранный домен. В другом или дополнительном варианте осуществления по меньшей мере один не встречающийся в природе иммунный рецептор способен рекрутировать по меньшей мере один связанный с TCR сигнальный модуль. В другом или дополнительном варианте осуществления по меньшей мере один не встречающийся в природе иммунный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR) или рекомбинантный TCR. В другом или дополнительном варианте осуществления по меньшей мере один антигенсвязывающий домен по меньшей мере, одного не встречающегося в природе иммунного рецептора связывается с антигеном, выбранным из группы, состоящей из CD5; CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS1 (также называется как подгруппа 1 CD2, CRACC, MPL, SLAMF7, CD319 и 19A24); лектиноподобной молекулы 1 С-типа (CLL-1 или CLECL1 - C-type lectin-like molecule-1); CD33; рецептора эпидермального фактора роста, вариант III (EGFRviii - epidermal growth factor receptor variant III); ганглиозида G2 (GD2 - ganglioside G2); ганглиозида GD3 (aNeu5Ac (2-8), aNeu5Ac (2-3) bDGalp (1-4) bDGlcp (1-1) Cer); белка созревания В-клеток члена семейства рецепторов TNF (BCMA - TNF receptor family member B cell maturation); антигена Tn ((Tn Ag) или (GalNAc α -Ser/Thr)); простат-специфического мембранного антигена (PSMA - prostate-specific membrane antigen); рецепторного тирозинкиназоподобного орфанного рецептора 1 (ROR1 - Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1); Fms подобной тирозинкиназы 3 (FLT3 - Fms Like Tyrosine Kinase 3); связанного с опухолью гликопротеина 72 (TAG72 - Tumor-associated glycoprotein 72); CD38; CD44v6; гликозилированного эпитопа CD43, экспрессируемого на клетках острого лейкоза или лимфомы, но не на гематопоэтических предшественниках, гликозилированного эпитопа CD43, экспрессируемого на клетках негематопоэтических раковых заболеваний, карциноэмбрионального антигена (CEA - Carcinoembryonic antigen); молекулы адгезии эпителиальных клеток (EPCAM - Epithelial cell adhesion molecule); B7H3 (CD276); KIT (CD117); субъединицы рецептора интерлейкина-13 альфа-2 (IL-13Ra2 (Interleukin-13 receptor subunit alpha-2) или CD213A2); мезотелина; рецептора интерлейкина 11 альфа (IL-11Ra - Interleukin 11 receptor alpha); антигена стволовых клеток простаты (PSCA - prostate stem cell antigen); протеиназы серина 21 (тестизина или PRSS21 - Protease Serine 21); рецептора сосудистого эндотелиального фактора роста 2 (VEGFR2- vascular endothelial growth factor receptor 2); антигена Льюиса (Y); CD24; бета-рецептора фактора роста, полученного из тромбоцитов (PDGFR-бета - Platelet-derived growth factor receptor beta); стадийно-специфического эмбрионального антигена-4 (SSEA-4 - Stage-specific embryonic antigen-4); CD20; альфа-рецептора фолата (FRa (Folate receptor alpha) или FR1); бета-

рецептора фолата (FRb - Folate receptor beta); рецепторной тирозин-протеинкиназы ERBB2 (Her2/neu); муцина 1, связанного с клеточной поверхностью (MUC1 - Mucin 1, cell surface associated); рецептора эпидермального фактора роста (EGFR - epidermal growth factor receptor); молекулы адгезии нервных клеток (NCAM - neural cell adhesion molecule); простаза; простатической кислой фосфатазы (PAP - prostatic acid phosphatase); мутированного фактора удлинения 2 (ELF2M - elongation factor 2 mutated); эфрина B2; белка активации фибробластов альфа (FAP - fibroblast activation protein alpha); рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (рецептора IGF-I (insulin-like growth factor 1 receptor)), карбоангидразы IX (CAIX - carbonic anhydrase IX); субъединицы протеасомы (просомы, макропаина), бета-тип а, 9 (LMP2 - Proteasome (Prosome, Macropain) Subunit, Beta Type, 9); гликопротеина 100 (gp100); слитого белка-онкогена, состоящего из кластерной области точки разрыва (BCR) и гомолога 1 вирусного онкогена мышинной лейкемии Абельсона (Abl) (bcr-abl); тирозиназы; рецептора 2 эфрина типа А (EphA2 - ephrin type-A receptor 2); молекулы адгезии сиалил Льюиса (sLe - sialyl Lewis adhesion molecule); ганглиозида GM3 (aNeu5Ac (2-3) bDCIalp (1-4) bDGlcP (1-1) Cer); трансглутаминазы 5 (TGS5 - transglutaminase 5); высокомолекулярного антигена, ассоциированного с меланомой (HMWMAA - high molecular weight-melanoma associated antigen); о-ацетил-GD2 ганглиозида (OAcGD2 - o-acetyl-GD2 ganglioside); эндотелиального маркера 1 опухоли (TEM1 (tumor endothelial marker 1)/CD248); эндотелиального маркера 7 опухоли (TEM7R - tumor endothelial marker 7-related); клодина 6 (CLDN6 - claudin 6); рецептора гормонов, стимулирующих щитовидную железу (TSHR - thyroid stimulating hormone receptor); рецептора, связанного с G белком, класса C, группы 5, члена D (GPRC5D - G protein coupled receptor class C group 5, member D); открытая рамка считывания 61 хромосомы X (CXORF61 - chromosome X open reading frame 61); CD97; CD179a; киназы анапластической лимфомы (ALK - anaplastic lymphoma kinase); полисиаловой кислоты; специфичной для плаценты 1 (PLAC1 - Polysialic acid; placenta-specific 1); гексасахаридной части globoH гликоцерамида (GloboH - hexasaccharide portion of globoH glycoseramide); антигена дифференцировки молочной железы (NY-BR-1 - mammary gland differentiation antigen); уроплакина 2 (UPK2 - uroplakin 2); клеточного рецептора вируса гепатита А 1 (HAVCR1 - Hepatitis A virus cellular receptor 1); адренорецептора бета 3 (ADRB3 - adrenoreceptor beta 3); паннексина 3 (PANX3 - pannexin 3); G-белок-связанного рецептора 20 (GPR20 - G protein-coupled receptor 20); комплекса антигена 6 лимфоцитов, локуса К 9 (LY6K - lymphocyte antigen 6 complex, locus K 9); обонятельного рецептора 51E2 (OR51E2 - Olfactory receptor 51E2); белка альтернативной рамки считывания ТКР гамма (TARP - TCR Gamma Alternate Reading Frame Protein); белка опухоли Вильмса (WT1 - Wilms tumor protein); антигена 1 рака/яичка (NY-ESO-1); антигена 2 рака/яичка (LAGE-1a); ассоциированного с меланомой антигена 1 (MAGE-A1 (Melanoma-associated antigen 1)); вариантного гена 6 ETS транслокации, расположенного на хромосоме 12p (ETV6-AML (ETS translocation-variant gene 6, located on chromosome 12p)); белка спермы 17 (SPA17 - sperm protein 17); члена 1А семейства X антигенов

(XAGE1 - X Antigen Family, Member 1A); ангиопозтинсвязывающего рецептора 2 клеточной поверхности (Tie 2 - angiopoietin-binding cell surface receptor 2); антигена-1 яичка рака меланомы (MAD-CT-1); антигена-2 яичка рака меланомы (MAD-CT-2 - melanoma cancer testis antigen-2); Fos-связанного антигена 1; опухолевого белка p53 (p53); мутанта p53; простерина; сурвивина; теломеразы; опухолевого антигена-1 рака карциномы простаты (PCT A-1 (prostate carcinoma tumor antigen-1) или Galectin 8), антигена 1 меланомы, распознаваемого Т-клетками (MelanA или MART1 (melanoma antigen recognized by T cells 1)); мутанта крысиной саркомы (Ras); обратной транскриптазы теломеразы человека (hTERT - human Telomerase reverse transcriptase); точек разрыва саркомы; ингибитора апоптоза меланомы (ML-IAP (melanoma inhibitor of apoptosis)); ERG (ген слияния трансмембранной протеазы серина 2 (TMPRSS2), ETS) (transmembrane protease, serine 2 (TMPRSS2) ETS fusion gene); N-ацетилглюкозаминилтрансферазы V (NA17 - N-Acetyl glucosaminyl-transferase V); белка с парными боксами Pax-3 (PAX3 - paired box protein Pax-3); андрогенного рецептора; циклина B1; гомолога, полученного из нейробластомы, вирусного онкогена v-мус птичьего миелоцитоматоза (MYCN - v-мус avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog); члена C семейства Ras гомологов (RhoC - Ras Homolog Family Member C); родственного тирозиназе белка 2 (TRP-2 - Tyrosinase-related protein 2); цитохрома P450 1B 1 (CYP1B 1 - Cytochrome P450 1B 1); подобного CCCTC-связывающему фактору (белку с цинковыми пальцами) (BORIS или брат регулятора сайтов импринтинга) (CCCTC-Binding Factor (Zinc Finger Protein)-Like (BORIS or Brother of the Regulator of imprinted Sites)), антигена 3 плоскоклеточной карциномы, распознаваемого Т-клетками (SART3 - Squamous Cell Carcinoma Antigen Recognized By T Cells 3); белка с парными боксами Pax-5 (PAX5 - Paired box protein Pax-5); проакрозин-связывающего белка sp32 (OY-TES1 - proacrosin binding protein sp32); лимфоцит-специфической протеинтирозинкиназы (LCK - lymphocyte-specific protein tyrosine kinase); якорного белка 4 киназы А (AKAP-4 - A kinase anchor protein 4); X точки разрыва 2 синовиальной саркомы (SSX2 - synovial sarcoma, X breakpoint 2); рецептора конечных продуктов усиленного гликирования (RAGE-1 - Receptor for Advanced Glycation Endproducts); почечного повсеместного 1 (RU1 - renal ubiquitous 1); почечного повсеместного 2 (RU2 - renal ubiquitous 2); легумаина; вируса папилломы человека Е6 (HPV E6 - human papilloma virus E6); вируса папилломы человека Е7 (HPV E7 - human papilloma virus E7); кишечной карбоксилэстеразы; мутированного белка теплового шока 70-2 (mut hsp70-2 - heat shock protein 70-2 mutated); CD79a; CD79b; CD72; связанного с лейкоцитами иммуноглобулин-подобного рецептора 1 (LAIR1 - Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1); Fc-фрагмента рецептора IgA (FCAR (Fc fragment of IgA receptor) или CD89); члена 2 подгруппы А лейкоцитарного иммуноглобулиноподобного рецептора (LILRA2 - Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily A member 2); член f семейства, подобного молекуле CD300 (CD300LF - CD300 molecule-like family member f); член А семейства 12 доменов лектинов С-типа (CLEC12A - C-type lectin domain family 12

member A); антигена 2 стромальных клеток костного мозга (BST2 - bone marrow stromal cell antigen 2); белка 2 подобного EGF-подобный модуль-содержащему муцин-подобному рецептору гормонов (EMR2 - EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 2); лимфоцитарного антигена 75 (LY75 - lymphocyte antigen 75); глипикана-3 (GPC3 - Glypican-3); Fc-рецепторо-подобного 5 (FCRL5 - Fc receptor-like 5); и иммуноглобулин лямбда-подобного полипептида 1 (IGLL1 - immunoglobulin lambda-like polypeptide 1), MPL, биотина, с-MYC эпитопного тэга, CD34, LAMP1 TROP2, GFRalpha4, CDH17, CDH6, NYBR1, CDH19, CD200R, SleA (CA19.9; антиген сиалила Льюиса); Фукозил-GM1, PTK7, gpNMB, CDH1-CD324, DLL3, CD276/B7H3, ИЛ11Pa, ИЛ13Pa2, CD179b-IGL1, ТКРгамма-дельта, NKG2D, CD32 (FCGR2A), Tn антигена, Tim1-/HVCR1, CSF2RA (GM-CSFR-альфа), TGFбетаP2, Люис антигена, цепи ТКР-бета1, цепи ТКР-бета2, цепи ТКР-гамма, цепи ТКР-дельта, FITC, рецептора леутенизирующего гормона (LHR - Leutenizing hormone receptor), рецептора фолликулостимулирующего гормона (FSHR - Follicle stimulating hormone receptor), рецептора гормона гонадотропина (CGHR (Gonadotropin Hormone receptor) или GR), CCR4, GD3, SLAMF6, SLAMF4, гликопротеина оболочки HIV1, HTLV1-Tax, CMV pp65, EBV-EBNA3c, KSHV K8.1, KSHV-gH, гемагглютинина вируса гриппа А (HA), GAD, PDL1, гуанилил циклазы С (GCC - Guanylyl cyclase C), аутоантитела к десмоглеину 3 (Dsg3 - desmoglein 3), аутоантитела к десмоглеину 1 (Dsg1 - desmoglein 1), HLA, HLA-A, HLA-A2, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, HLA-G, IgE, CD99, Ras G12V, тканевого фактора 1 (TF1 - Tissue Factor 1), AFP, GPRC5D, Клаудина18.2 (CLD18A2 или CLDN18A.2), P- гликопротеина, STEAP1, Liv1, Нектина-4, Крипто, gpA33, BST1/CD157, хлоридного канала с низкой проводимостью и антигена, распознаваемого антителом TNT. В другом или дополнительном варианте осуществления по меньшей мере один не встречающийся в природе агент, способный к селективной активации NF-кВ пути выбран из группы, состоящей из vFLIP K13, K13-opt, NEMO мутанта, NEMO -слитого белка, ИКК1-S176E-S180E, ИКК2-S177E-S181E, RIP, ИКК α , ИКК β , Tcl-1, MyD88-L265, любого белка-активатора NF-кВ или фрагмента белка-активатора, любого ингибитора ингибитора пути NF-кВ, любой системы редактирования генов, способной селективно активировать NF-кВ, любого их гомолога или варианта и любой их комбинации. В другом или дополнительном варианте осуществления по меньшей мере один не встречающийся в природе агент, способный к селективной активации NF-кВ пути имеет не-вирусное происхождение. В другом или дополнительном варианте осуществления по меньшей мере один не встречающийся в природе агент, способный к селективной активации NF-кВ пути представляет собой систему редактирования гена. В другом или дополнительном варианте осуществления по меньшей мере один не встречающийся в природе агент, способный к селективной активации NF-кВ пути индуцирует олигомеризации NEMO/ИКК γ . В другом или дополнительном варианте осуществления по меньшей мере один не встречающийся в природе агент, способный к селективной активации NF-кВ пути индуцирует активацию комплекса ИКК. В другом или дополнительном варианте осуществления по меньшей мере

один не встречающийся в природе агент, способный к селективной активации NF-κB пути не активирует АКТ пути. В другом или дополнительном варианте осуществления по меньшей мере один не встречающийся в природе агент, способный к селективной активации NF-κB пути экспрессируется конститутивным или индуцируемым способом. В другом или дополнительном варианте осуществления по меньшей мере один не встречающийся в природе агент, способный к селективной активации NF-κB пути экспрессируется транзистентно. В другом или дополнительном варианте осуществления по меньшей мере один не встречающийся в природе агент, способный к селективной активации NF-κB пути экспрессируется стабильно. В другом или дополнительном варианте осуществления, активность по меньшей мере, одного не встречающегося в природе агента, способного к избирательной активации NF-κB пути контролируется посттрансляционно через контактирование клетки с соединением. В другом или дополнительном варианте осуществления по меньшей мере один не встречающийся в природе агент, способный к селективной активации NF-κB пути экспрессируется в виде слитой конструкции с одним или более экземпляров домена-переключателя (switch domain). В другом или дополнительном варианте осуществления, активность по меньшей мере, одного не встречающегося в природе агента, способного к избирательной активации NF-κB пути контролируется на пост-трансляционном уровне путем введения терапевтически эффективного количества соединения, которое индуцирует димеризацию домена-переключателя. В другом или дополнительном варианте осуществления, домен-переключатель содержит один или большее количество копий домена в FKBP12. В другом или дополнительном варианте осуществления, соединение представляет собой AP20187 или римидуцид или его гомолог. В другом или дополнительном варианте осуществления иммунная Т клетка представляет собой Т-лимфоцит (Т клетку), клетку CAR-T, экспрессирующую TCR Т-клетку, инфильтрирующий опухоль лимфоцит (TIL), резидентный лимфоцит ткани, стволовую клетку, индуцированную плюрипотентную стволовую клетку или клетку-естественный килер (NK). В другом или дополнительном варианте осуществления, иммунная клетка была сконструирована так, чтобы быть лишенной функционального нативного сигнального комплекса Т-клеточного рецептора (TCR) и/или β2 микроглобулина. В другом или дополнительном варианте осуществления по меньшей мере один не встречающийся в природе иммунный рецептор, и/или по меньшей мере один агент, способный к избирательной активации сигнального пути NF-κB клонируют в эндогенный ген TCR таким образом, что экспрессия указанного по меньшей мере, одного не встречающегося в природе иммунного рецептора и/или указанного по меньшей мере, одного агента, способного к избирательной активации сигнального пути NF-κB находятся под контролем эндогенных регуляторных элементов/промотора гена TCR. Данное изобретение также предусматривает использование иммунной клетки или популяции иммунных клеток, как описано в данном документе, для профилактики и лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из рака, инфекционных заболеваний, иммунных заболеваний и аллергических заболеваний, В другом или

дополнительном варианте осуществления по меньшей мере один полинуклеотид кодирует по меньшей мере один не встречающийся в природе иммунный рецептор и по меньшей мере один не встречающийся в природе агент, способный к селективной активации NF-κB сигнального пути, экспрессированы с одного промотора. В другом или дополнительном варианте осуществления по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один не встречающийся в природе иммунный рецептор и по меньшей мере один не встречающийся в природе агент, способный к селективной активации сигнального пути NF-κB экспрессируется с использованием двух или более отдельных промоторов. В другом или дополнительном варианте осуществления по меньшей мере один полинуклеотид содержит первую последовательность, кодирующую нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере один не встречающийся в природе иммунный рецептор, отделенный от второй последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей не встречающийся в природе агент, способный селективно активировать NF-κB так, что при экспрессии первой и второй последовательностей, кодирующих нуклеиновую кислоту, не встречающийся в природе иммунный рецептор и не встречающийся в природе агент, способный селективно активировать NF-κB, не связаны физически или химически. В другом или дополнительном варианте осуществления кодирующие полинуклеотиды по меньшей мере одного не встречающегося в природе иммунного рецептора и/или по меньшей мере, одного не встречающегося в природе агента, способного к селективной активации NF-κB клонируют в эндогенный ген TCR таким образом, что по меньшей мере один не встречающийся в природе иммунный рецептор и/или по меньшей мере один не встречающийся в природе агент, способный к селективной активации NF-κB находятся под контролем эндогенных регуляторных элементов/промотора гена TCR. В другом или дополнительном варианте осуществления, один или более константные цепи генов TCR функционально реэкспрессированы.

[0006] Данное раскрытие также обеспечивает по меньшей мере один рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один не встречающийся в природе иммунный рецептор, причем указанный по меньшей мере один рекомбинантный полинуклеотид включает (a) первый домен нуклеиновой кислоты, кодирующий частичный или полный трансмембранный и/или цитоплазматический домен и, необязательно, внеклеточный домен эндогенного белка, при этом указанный эндогенный белок экспрессируется на поверхности лимфоцитов и запускает активацию и/или пролиферацию лимфоцитов; (b) необязательно полинуклеотидный линкер; (c) второй домен нуклеиновой кислоты, функционально связанный с первым доменом нуклеиновой кислоты, при этом второй домен нуклеиновой кислоты кодирует один или большее количество неприродных антигенсвязывающих доменов TCR; (d) необязательный третий домен нуклеиновой кислоты, кодирующий костимуляторный домен; и (e) необязательный дополнительный домен нуклеиновой кислоты, кодирующий вспомогательный модуль.

[0007] Данное раскрытие также обеспечивает по меньшей мере один

рекомбинантный полинуклеотид, содержащий первую нуклеиновую кислоту, кодирующую не встречающийся в природе иммунный рецептор; и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую вспомогательный модуль, содержащий селективный активатор NF-κB. В одном варианте осуществления первая нуклеиновая кислота и вторая нуклеиновая кислота разделены олигонуклеотидным линкером, кодирующим разрезаемый пептидный линкер. В другом варианте осуществления указанный по меньшей мере один содержит два рекомбинантных полинуклеотида, так что первая нуклеиновая кислота и вторая нуклеиновая кислота экспрессируются из отдельных векторов. В другом или дополнительном варианте осуществления селективный активатор NF-κB представляет собой не встречающийся в природе селективный активатор NF-κB. В другом или дополнительном варианте осуществления не встречающийся в природе иммунный рецептор выбран из группы, состоящей из CAR, Ab-TCR, TFP, cTCR, SIR и рекомбинантного TCR. В другом или дополнительном варианте осуществления не встречающийся в природе иммунный рецептор содержит (i) внеклеточный антигенспецифический домен, (ii) трансмембранный домен и (iii) необязательный внутриклеточный сигнальный домен, содержащий иммунорецепторный мотив активации на основе тирозина (ITAM), при этом (iii) расположен на C-конце не встречающегося в природе иммунного рецептора. В другом или дополнительном варианте осуществления при экспрессии первой и второй последовательностей нуклеиновых кислот не встречающийся в природе иммунный рецептор и селективный полипептид-активатор NF-κB не связаны физически или химически. В другом или дополнительном варианте осуществления внеклеточный антиген-специфический домен связывается с любым одним или несколькими из CD5; CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS1 (также называется как подгруппа 1 CD2, CRACC, MPL, SLAMF7, CD319 и 19A24); лектиноподобной молекулы 1 C-типа (CLL-1 или CLECL1); CD33; рецептора эпидермального фактора роста, вариант III (EGFRviii); ганглиозида G2 (GD2); ганглиозида GD3 (aNeu5Ac (2-8), aNeu5Ac (2-3) bDGalp (1-4) bDGlcp (1-1) Cer); белка созревания В-клеток члена семейства рецепторов TNF (BCMA); антигена Tn ((Tn Ag) или (GalNAcα-Ser/Thr)); простат-специфического мембранного антигена (PSMA); рецепторного тирозинкиназоподобного орфанного рецептора 1 (ROR1); Fms подобной тирозинкиназы 3 (FLT3); связанного с опухолью гликопротеина 72 (TAG72); CD38; CD44v6; гликозилированного эпитопа CD43, экспрессируемого на клетках острого лейкоза или лимфомы, но не на гематопоэтических предшественниках, гликозилированного эпитопа CD43, экспрессируемого на клетках негематопоэтических раковых заболеваний, карциноэмбрионального антигена (CEA); молекулы адгезии эпителиальных клеток (EPCAM); V7H3 (CD276); KIT (CD117); субъединицы рецептора интерлейкина-13 альфа-2 (IL-13Ra2 или CD213A2); мезотелина; рецептора интерлейкина 11 альфа (IL-11Ra); антигена стволовых клеток простаты (PSCA); протеиназы серина 21 (тестизина или PRSS21); рецептора сосудистого эндотелиального фактора роста 2 (VEGFR2); антигена Льюиса (Y); CD24; бета-рецептора фактора роста, полученного из тромбоцитов (PDGFR-бета); стадийно-специфического эмбрионального

антигена-4 (SSEA-4); CD20; альфа-рецептора фолата (FRa или FR1); бета-рецептора фолата (FRb); рецепторной тирозин-протеинкиназы ERBB2 (Her2/neu); муцина 1, связанного с клеточной поверхностью (MUC1); комплекса AFP/МНС; рецептора эпидермального фактора роста (EGFR); молекулы адгезии нервных клеток (NCAM); простаза; простатической кислой фосфатазы (PAP); мутированного фактора удлинения 2 (ELF2M); эфрина В2; белка активации фибробластов альфа (FAP); рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (рецептора IGF-I), карбоангидразы IX (CAIX); субъединицы протеасомы (просомы, макропаина), бета-тип а, 9 (LMP2); гликопротеина 100 (gp100); слитого белка-онкогена, состоящего из кластерной области точки разрыва (BCR) и гомолога 1 вирусного онкогена мышшиной лейкозы Абельсона (Abl) (bcg-abl); тирозиназы; рецептора 2 эфрина типа А (EphA2); молекулы адгезии сиалил Льюиса (sLe); ганглиозида GM3 (aNeu5Ac (2-3) bDCIalp (1-4) bDGlcр (1-1) Cer); трансглутаминазы 5 (TGS5); высокомолекулярного антигена, ассоциированного с меланомой (HMWMAA); о-ацетил-GD2 ганглиозида (OAcGD2); эндотелиального маркера 1 опухоли (TEM1/CD248); эндотелиального маркера 7 опухоли (TEM7R); клодина 6 (CLDN6); рецептора гормонов, стимулирующих щитовидную железу (TSHR); рецептора, связанного с G белком, класса С, группы 5, члена D (GPRC5D); открытая рамка считывания 61 хромосомы X (CXORF61); CD97; CD179a; киназы анапластической лимфомы (ALK); полисиаловой кислоты; специфичной для плаценты 1 (PLAC1); гексасахаридной части globoH гликоцерамида (GloboH); антигена дифференцировки молочной железы (NY-BR-1); уроплакина 2 (UPK2); клеточного рецептора вируса гепатита А 1 (HAVCR1); адренорецептора бета 3 (ADRB3); паннексина 3 (PANX3); G-белок-связанного рецептора 20 (GPR20); комплекса антигена 6 лимфоцитов, локуса К 9 (LY6K); обонятельного рецептора 51E2 (OR51E2); белка альтернативной рамки считывания TCR гамма (TARP); белка опухоли Вильмса (WT1); комплекса WT1/МНС I; антигена 1 рака/яичка (NY-ESO-1); комплекса NY-ESO-1/МНС I; антигена 2 рака/яичка (LAGE-1a); ассоциированного с меланомой антигена 1 (MAGE-A1); вариантного гена 6 ETS транслокации, расположенного на хромосоме 12p (ETV6-OMJ); белка спермы 17 (SPA17); члена 1А семейства X антигенов (XAGE1); ангиопоэтинсвязывающего рецептора 2 клеточной поверхности (Tie 2); антигена-1 яичка рака меланомы (MAD-CT-1); антигена-2 яичка рака меланомы (MAD-CT-2); Fos-связанного антигена 1; опухолевого белка p53 (p53); мутанта p53; простерина; сурвивина; теломеразы; опухолевого антигена-1 рака карциномы простаты (PCT A-1 или Galectin 8), антигена 1 меланомы, распознаваемого Т-клетками (MelanA или MART1); мутанта крысиной саркомы (Ras); обратной транскриптазы теломеразы человека (hTERT); точек разрыва саркомы; ингибитора апоптоза меланомы (ML-IAP); ERG (ген слияния трансмембранной протеазы серина 2 (TMPRSS2), ETS); N-ацетилглюкозаминилтрансферазы V (NA17); белка с парными боксами Pax-3 (PAX3); андрогенного рецептора; циклина В1; гомолога, полученного из нейробластомы, вирусного онкогена v-мус птичьего миелоцитоматоза (MYCN); члена С семейства Ras гомологов (RhoC); родственного тирозиназе белка 2 (TRP-2); цитохрома P450 1B 1

(CYP1B 1); подобного CCCTC-связывающему фактору (белку с цинковыми пальцами) (BORIS или брат регулятора сайтов импринтинга), антигена 3 плоскоклеточной карциномы, распознаваемого Т-клетками (SART3); белка с парными боксами Pax-5 (PAX5); проакрозин-связывающего белка sp32 (OY-TE51); лимфоцит-специфической протеинтирозинкиназы (LCK); якорного белка 4 киназы А (AKAP-4); Х точки разрыва 2 синовиальной саркомы (SSX2); рецептора конечных продуктов усиленного гликирования (RAGE-1); почечного повсеместного 1 (RU1); почечного повсеместного 2 (RU2); легумаина; вируса папилломы человека Е6 (HPV Е6); комплекса HPV Е6/МНС I ;вируса папилломы человека Е7 (HPV Е7); комплекса HPV Е7/МНС I; комплекса AFP/МНС I; комплекса Ras/МНС I; кишечной карбоксилэстеразы; мутированного белка теплового шока 70-2 (mut hsp70-2); CD79a; CD79b; CD72; связанного с лейкоцитами иммуноглобулин-подобного рецептора 1 (LAIR1); Fc-фрагмента рецептора IgA (FCAR или CD89); члена 2 подгруппы А лейкоцитарного иммуноглобулиноподобного рецептора (LILRA2); член f семейства, подобного молекуле CD300 (CD300LF); член А семейства 12 доменов лектинов С-типа (CLEC12A); антигена 2 стромальных клеток костного мозга (BST2); белка 2 подобного EGF-подобный модуль-содержащему муцин-подобному рецептору гормонов (EMR2); лимфоцитарного антигена 75 (LY75); глипикана-3 (GPC3); Fc-рецепторо-подобного 5 (FCRL5); и иммуноглобулин лямбда-подобного полипептида 1 (IGLL1), MPL, биотина, с-MYC эпитопного тэга, CD34, LAMP1 TROP2, GFRalpha4, CDH17, CDH6, NYBR1, CDH19, CD200R, SleA (CA19.9; антиген сиалила Льюиса); Фукозил-GM1, PTK7, gpNMB, CDH1-CD324, DLL3, CD276/B7H3, IL11Ra, IL13Ra2, CD179b-IGLL1, TCRгамма-дельта, NKG2D, CD32 (FCGR2A), Tn антигена, Tim1-/HVCR1, CSF2RA (GMCSFR-альфа), TGFбетаP2, Люис антигена, цепи TCR-бета1, цепи TCR-бета2, цепи TCR-гамма, цепи TCR-дельта, FITC, рецептора леутенизирующего гормона (LHR), рецептора фолликулостимулирующего гормона (FSHR), рецептора гормона гонадотропина (CGHR или GR), CCR4, GD3, SLAMF6, SLAMF4, гликопротеина оболочки HIV1, HTLV1-Tax, CMV pp65, EBV-EBNA3c, KSHV K8.1, KSHV-gH, гемагглютинаина вируса гриппа А (HA), GAD, PDL1, гуанилил циклазы С (GCC), аутоантитела к десмоглеину 3 (Dsg3), аутоантитела к десмоглеину 1 (Dsg1), HLA, HLA-A, HLA-A2, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, HLA-G, IgE, CD99, Ras G12V, тканевого фактора 1 (TF1), AFP, GPRC5D, Клаудина18.2 (CLD18A2 или CLDN18A.2), Р- гликопротеина, STEAP1, Liv1, нектина-4, Крипто, gpA33, BST1/CD157, хлоридного канала с низкой проводимостью и антигена, распознаваемого антителом TNT. В другом или дополнительном варианте осуществления агент, способный к селективной активации NF-кВ пути выбран из группы, состоящей из vFLIP K13, K13-opt, NEMO мутанта, NEMO -слитого белка, IKK1-S176E-S180E, IKK2-S177E-S181E, RIP, FKBPx2-RIP-ID, IKK1, FKBPx2-IKK α , IKK2, Tcl-1, MyD88-L265, любого белка-активатора NF-кВ или фрагмента белка-активатора, любого ингибитора ингибитора пути NF-кВ, любой системы редактирования генов, способной селективно активировать NF-кВ, любого их гомолога или варианта и любой их комбинации. В другом или дополнительном варианте

осуществления селективный активатор NF-κB экспрессируется в виде слитой конструкции с одной или несколькими копиями домена FKBP. В другом или дополнительном варианте осуществления внеклеточный антигенспецифический домен выбран из группы, состоящей из: вариабельной области тяжелой цепи (vH) антитела или ее фрагмента, специфичных к предварительно определенному антигену-мишени; вариабельной области легкой цепи (vL) антитела или ее фрагмента, специфичных к предварительно определенному антигену-мишени; вариабельного одноцепочечного фрагмента (scFv) или его фрагмента, специфичных к предварительно определенному антигену-мишени; фрагмента антитела (*например*, Fv, Fab, а (Fab ') 2), специфичного к предварительно определенному антигену-мишени; фрагментов однодоменного антитела (SDAB), специфичных к предварительно определенному антигену-мишени; vHH-домен верблюдовых, специфичный к предварительно определенному антигену-мишени; неиммуноглобулиновых антигенсвязывающих каркасов, специфичных к предварительно определенному антигену-мишени; специфичных рецепторов к предварительно определенному антигену-мишени или их фрагментов; лигандов или их фрагментов, специфичных к предварительно определенному антигену-мишени; биспецифического антитела, фрагмента антитела, -scFV, -vHH, -SDAB, не иммуноглобулинового антиген-связывающего каркаса, рецептора или лиганда, специфичных к одному или нескольким predetermined антигенами-мишеням; и аутоантигена или его фрагмента.

[0008] Данное раскрытие также обеспечивает по меньшей мере один вектор, содержащий по меньшей мере один полинуклеотид из любой из вышеупомянутых полинуклеотидных конструкций, описанных в данном параграфе и выше. В одном варианте осуществления вектор выбран из группы, состоящей из ДНК вектора, РНК вектора, плазмиды, лентивирусного вектора, аденовирусного вектора, AAV вектора, ретровирусного вектора, бакуловирусного вектора, вектора на основе транспозона спящая красавица и вектора на основе транспозона свиней.

[0009] Данное раскрытие также обеспечивает иммунную эффекторную клетку или стволовую клетку, содержащую по меньшей мере один рекомбинантный полинуклеотид, конструкцию или вектор, описанные в данном разделе и выше. В одном варианте осуществления иммунная клетка представляет собой антигенпрезентирующую клетку. В другом или дополнительном варианте осуществления иммунная эффекторная клетка представляет собой человеческую Т клетку, человеческую NKT-клетку или синтетическую Т клетку, NK-клетку или стволовую клетку, которая может давать иммунную эффекторную клетку, необязательно, при этом Т клетка является дефицитной по диаглицеролкиназе (DGK) и/или Ikaros и/или Brd4.

[0010] Данное раскрытие также предоставляет способ (i) продления срока жизни экспрессирующей иммунной клетки, (ii) стимуляции пролиферации иммунной клетки, (iii) стимуляции выработки цитокинов иммунной клеткой, (iv) улучшения презентации антигена посредством иммунной клетки (v) защиты иммунной клетки от апоптоза, причем этот способ включает трансфекцию или трансформацию иммунных клеток

полинуклеотидом, кодирующим селективный активатор NF-κB или NF-κB-специфический стимулирующий полипептид. В одном варианте осуществления, селективный NF-κB активатор или конкретный NF-κB стимулирующий полипептид выбран из группы, состоящей из vFLIP K13, K13-opt, мутанта NEMO, слитого белка NEMO, IKK1- S176E-S180E, IKK2-S177E-S181E, RIP, IKKα, IKKβ, Tcl-1, MyD88-L265, любого белка-активатора или фрагмент белка-активатора NF-κB, любого ингибитора ингибитора пути NF-κB, любого их гомолог или их варианта и любой их комбинации. В другом или дополнительном варианте осуществления, селективный NF-κB активатор или конкретный NF-κB стимулирующий полипептид экспрессируется конститутивным или индуцируемым способом. В другом или дополнительном варианте осуществления, селективный NF-κB активатор или конкретный NF-κB стимулирующий полипептид контролируется посттрансляционно через контактирование T клетки с соединением. В другом или дополнительном варианте осуществления, селективный NF-κB активатор или конкретный NF-κB стимулирующий полипептид экспрессируется в виде слитой конструкции с одним или более экземпляров домена FKBP. В другом или дополнительном варианте осуществления, активность селективного NF-κB активатора или конкретного NF-κB стимулирующего полипептида контролируется на пост-трансляционном уровне путем введения терапевтически эффективного количества соединения, которое индуцирует димеризацию домена FKBP. В другом или дополнительном варианте осуществления, соединение представляет собой AP20187 или римидуцид.

[0011] Данное раскрытие также предоставляет способ получения иммунной эффекторной клетки экспрессирующей не встречающийся в природе иммунный рецептор, включающий введение по меньшей мере одного вектора или по меньшей мере одной рекомбинантной полинуклеотидной конструкции по данному изобретению в иммунную эффекторную клетку, или гематопозитическую стволовую клетку или клетку-предшественник которые могут давать начало иммунной эффекторной клетке в условиях, при которых экспрессируется не встречающийся в природе иммунный рецептор, и иммунная эффекторная клетка имеет такие характеристики: (i) увеличенную продолжительность жизни, (ii) улучшенную пролиферацию T-клеток и/или (iii) уменьшенный апоптоз по сравнению с клеткой CAR-T, в которой отсутствует специфический стимулирующий полипептид NF-κB. В другом или дополнительном варианте осуществления указанный способ дополнительно включает обеспечение популяции иммунных эффекторных клеток; и удаление T-регуляторных клеток из популяции, тем самым обеспечивая популяцию деплетированную от T-регуляторных клеток; причем стадии выполняются до введения в популяцию вектора или рекомбинантного полинуклеотида, кодирующего CAR и/или NF-κB-специфический стимулирующий полипептид. В другом или дополнительном варианте осуществления T-регуляторные клетки удаляют из популяции клеток с использованием антитела против CD25 или антитела против GITR. В другом или дополнительном варианте осуществления указанный способ дополнительно включает а) обеспечение популяции иммунных

эффекторных клеток; и b) обогащение популяции Р-гликопротеин (P-gp или Pgp; MDR1, ABCB1, CD243) -позитивных клеток, обеспечивая тем самым популяцию обогащенную Р-гликопротеин (P-gp или Pgp; MDR1, ABCB1, CD243) -позитивными клетками; при этом стадии а) и b) проводят до или после введения вектора или рекомбинантного полинуклеотида, кодирующего CAR и/или NF-κB-специфического стимулирующего полипептида. В другом или дополнительном варианте осуществления на Р-гликопротеин-позитивные клетки обогащают с использованием любого одного или большего количества способов, выбранных из группы, состоящей из i) иммуноселекции с использованием одного или набора специфических к Р-гликопротеину антител, ii) окрашивания одним или большим количеством флуоресцентных красителей, которые являются субстратами Р-гликопротеина (метилового эфира тетраметилродамина (TMRM), адриамицина и актиномицина-D) в условиях, при которых Р-гликопротеин активен в качестве насоса и происходит обогащение клетками, которые меньше окрашиваются красителем, iii) отбора клеток, устойчивых к фототоксическим соединениям, являющимся субстратами Р-гликопротеина, таким как любой один или большее количество из ТН9402, гидрохлорид метилового эфира 2-(4,5-дибром-6-амино-3-имино-3Н-ксантен-9-ила) бензойной кислоты, гидрохлорид этилового эфира 2-(4,5-дибром-6-амино-3-имино-3Н-ксантен-9-ил) бензойной кислоты, гидрохлорида октилового эфира 2-(4,5-дибром-6-амино-3-имино-3Н-ксантен-9-ил) бензойной кислоты, гидрохлорида н-бутилового эфира 2-(4,5-дибром-6-амино-3-имино-3Н-ксантен-9-ил) бензойной кислоты, гидрохлорида н-бутилового эфира 2-(6-этиламино-3-этиламино-3Н-ксантен-9-ил) бензойной кислоты или их производных или их комбинаций, и iv) отбора клеток, устойчивых к цитотоксичности соединений, которые являются субстратами Р-гликопротеина, таких как винкристин, винбластин, таксол, паклитаксел, митоксантрон, этопозид, адриамицин, даунорубин и актиномицин-D.

[0012] Данное раскрытие также обеспечивает способ генерации популяции РНК-сконструированных клеток, включающий введение *in vitro* транскрибированной РНК или *in vitro* транскрибированных РНК или синтетической РНК или синтетических РНК в клетку или популяцию клеток, при этом указанные РНК содержат рекомбинантный полинуклеотид или полинуклеотиды по данному изобретению.

[0013] Данное раскрытие также обеспечивает способ обеспечения иммунитета против заболевания у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества иммунной эффекторной клетки или стволовой клетки, которая может дать начало иммунной эффекторной клетке по данному изобретению, при этом указанная клетка представляет собой аутологичную Т клетку или аллогенную Т клетку, или аутологичную НКТ-клетку, или аллогенную НКТ-клетку, или аутологичную или аллогенную гемопоэтическую стволовую клетку, или аутологичную или аллогенную iPSC, которые могут давать начало иммунной эффекторной клетке. В другом или дополнительном варианте осуществления аллогенные Т клетки или аллогенные НКТ-клетки или гемопоэтические стволовые клетки или iPSC не экспрессируют или имеют

низкую экспрессию функционального TCR или функционального HLA.

[0014] Данное раскрытие также обеспечивает композицию, содержащую иммунную эффекторную клетку или стволовую клетку, которая может генерировать иммунные эффекторные клетки, содержащие не встречающийся в природе иммунный рецептор и селективный активатор NF-κB, при этом указанный не встречающийся в природе иммунный рецептор содержит антигенсвязывающие домены, которые связываются с ассоциированным с заболеванием антигеном, при этом указанный ассоциированный с заболеванием антиген выбран из группы, состоящей из: CD5; CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS1 (также называется как подгруппа 1 CD2, CRACC, SLAMF7, CD319 и 19A24); лектиноподобной молекулы 1 С-типа (CLL-1 или CLECL1); CD33; рецептора эпидермального фактора роста, вариант III (EGFRviii); ганглиозида G2 (GD2); ганглиозида GD3 (aNeu5Ac (2-8), aNeu5Ac (2-3) bDGalp (1-4) bDGlcp (1-1) Cer); белка созревания В-клеток члена семейства рецепторов TNF (BCMA); антигена Tn ((Tn Ag) или (GalNAcα-Ser/Thr)); простат-специфического мембранного антигена (PSMA); рецепторного тирозинкиназоподобного орфанного рецептора 1 (ROR1); Fms подобной тирозинкиназы 3 (FLT3); связанного с опухолью гликопротеина 72 (TAG72); CD38; CD44v6; гликозилированного эпитопа CD43, экспрессируемого на клетках острого лейкоза или лимфомы, но не на гематопозитических предшественниках, гликозилированного эпитопа CD43, экспрессируемого на клетках негематопозитических раковых заболеваний, карциноэмбрионального антигена (CEA); молекулы адгезии эпителиальных клеток (EPCAM); V7H3 (CD276); KIT (CD117); субъединицы рецептора интерлейкина-13 альфа-2 (IL-13Ra2 или CD213A2); мезотелина; рецептора интерлейкина 11 альфа (IL-11Ra); антигена стволовых клеток простаты (PSCA); протеиназы серина 21 (тестизина или PRSS21); рецептора сосудистого эндотелиального фактора роста 2 (VEGFR2); антигена Льюиса (Y); CD24; бета-рецептора фактора роста, полученного из тромбоцитов (PDGFR-бета); стадийно-специфического эмбрионального антигена-4 (SSEA-4); CD20; альфа-рецептора фолата; рецепторной тирозин-протеинкиназы ERBB2 (Her2/neu); муцина 1, связанного с клеточной поверхностью (MUC1); рецептора эпидермального фактора роста (EGFR); молекулы адгезии нервных клеток (NCAM); простазы; простатической кислой фосфатазы (PAP); мутированного фактора удлинения 2 (ELF2M); эфрина В2; белка активации фибробластов альфа (FAP); рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (рецептора IGF-I), карбоангидразы IX (CAIX); субъединицы протеасомы (просомы, макропаина), бета-тип а, 9 (LMP2); гликопротеина 100 (gp100); слитого белка-онкогена, состоящего из кластерной области точки разрыва (BCR) и гомолога 1 вирусного онкогена мышшиной лейкозы Абельсона (Abl) (bcg-abl); тирозиназы; рецептора 2 эфрина типа А (EphA2); фукозила GM1, молекулы адгезии сиалил Льюиса (sLe); ганглиозида GM3 (aNeu5Ac (2-3) bDClalp (1-4) bDGlcp (1-1) Cer); трансглутаминазы 5 (TGS5); высокомолекулярного антигена, ассоциированного с меланомой (HMWMAA); о-ацетил-GD2 ганглиозида (OAcGD2); эндотелиального маркера 1 опухоли (TEM1/CD248); эндотелиального маркера 7 опухоли (TEM7R); клодина 6

(CLDN6); рецептора гормонов, стимулирующих щитовидную железу (TSHR); рецептора, связанного с G белком, класса C, группы 5, члена D (GPRC5D); открытая рамка считывания 61 хромосомы X (CXORF61); CD97; CD179a; киназы анапластической лимфомы (ALK); полисиаловой кислоты; специфичной для плаценты 1 (PLAC1); гексахаридной части globoH гликоцерамида (GloboH); антигена дифференцировки молочной железы (NY-BR-1); уроплакина 2 (UPK2); клеточного рецептора вируса гепатита А 1 (HAVCR1); адренорецептора бета 3 (ADRB3); паннексина 3 (PANX3); G-белок-связанного рецептора 20 (GPR20); комплекса антигена 6 лимфоцитов, локуса К 9 (LY6K); обонятельного рецептора 51E2 (OR51E2); белка альтернативной рамки считывания TCR гамма (TARP); белка опухоли Вильмса (WT1); антигена 1 рака/яичка (NY-ESO-1); антигена 2 рака/яичка (LAGE-1a); ассоциированного с меланомой антигена 1 (MAGE-A1); вариантного гена 6 ETS транслокации, расположенного на хромосоме 12p (ETV6-OMJ); белка спермы 17 (SPA17); члена 1A семейства X антигенов (XAGE1); ангиопоэтинсвязывающего рецептора 2 клеточной поверхности (Tie 2); антигена-1 яичка рака меланомы (MAD-CT-1); антигена-2 яичка рака меланомы (MAD-CT-2); Fos-связанного антигена 1; опухолевого белка p53 (p53); мутанта p53; простерина; сурвивина; теломеразы; опухолевого антигена-1 рака карциномы простаты (PCT A-1 или Galectin 8), антигена 1 меланомы, распознаваемого Т-клетками (MelanA или MART1); мутанта крысиной саркомы (Ras); обратной транскриптазы теломеразы человека (hTERT); точек разрыва саркомы; ингибитора апоптоза меланомы (ML-IAP); ERG (ген слияния трансмембранной протеазы серина 2 (TMPRSS2), ETS); N-ацетилглюкозаминилтрансферазы V (NA17); белка с парными боксами Pax-3 (PAX3); андрогенного рецептора; циклина B1; гомолога, полученного из нейробластомы, вирусного онкогена v-мус птичьего миелоцитоматоза (MYCN); члена C семейства Ras гомологов (RhoC); родственного тирозиназе белка 2 (TRP-2); цитохрома P450 1B 1 (CYP1B 1); подобного CCCTC-связывающему фактору (белку с цинковыми пальцами) (BORIS или брат регулятора сайтов импринтинга), антигена 3 плоскоклеточной карциномы, распознаваемого Т-клетками (SART3); белка с парными боксами Pax-5 (PAX5); проакрозин-связывающего белка sp32 (OY-TE51); лимфоцит-специфической протеинтирозинкиназы (LCK); якорного белка 4 киназы А (AKAP-4); X точки разрыва 2 синовиальной саркомы (SSX2); рецептора конечных продуктов усиленного гликирования (RAGE-1); почечного повсеместного 1 (RU1); почечного повсеместного 2 (RU2); легумаина; вируса папилломы человека Е6 (HPV E6); вируса папилломы человека Е7 (HPV E7); кишечной карбоксилэстеразы; мутированного белка теплового шока 70-2 (mut hsp70-2); CD79a; CD79b; CD72; связанного с лейкоцитами иммуноглобулин-подобного рецептора 1 (LAIR1); Fc-фрагмента рецептора IgA (FCAR или CD89); члена 2 подгруппы А лейкоцитарного иммуноглобулиноподобного рецептора (LILRA2); член f семейства, подобного молекуле CD300 (CD300LF); член А семейства 12 доменов лектинов С-типа (CLEC12A); антигена 2 стромальных клеток костного мозга (BST2); белка 2 подобного EGF-подобный модуль-содержащему муцин-подобному рецептору гормонов (EMR2);

лимфоцитарного антигена 75 (LY75); глипикана-3 (GPC3); Fc-рецепторо-подобного 5 (FCRL5); и иммуноглобулин лямбда-подобного полипептида 1 (IGLL1), MPL, биотина, с-MYC эпитопного тэга, CD34, LAMP1 TROP2, GFRalpha4, CDH17, CDH6, NYBR1, CDH19, CD200R, Slea (CA19.9; антиген сиалила Льюиса); Фукозил-GM1, PTK7, gpNMB, CDH1-CD324, DLL3, CD276/B7H3, IL11Ra, IL13Ra2, CD179b-IGL11, ALK TCR гамма-дельта, NKG2D, CD32 (FCGR2A), CSPG4-HMW-MAA, Tim1-/HVFR1, CSF2RA (GMCSFR-альфа), TGFбетаP2, VEGFR2/KDR, Люис антигена, цепи TCR-бета1, цепи TCR-бета2, цепи TCR-гамма, цепи TCR-дельта, FITC, рецептора леутенизирующего гормона (LHR), рецептора фолликулостимулирующего гормона (FSHR), рецептора гормона хорионического гонадотропина (CGHR), CCR4, SLAMF6, SLAMF4, гликопротеина оболочки HIV1, HTLV1-Tax, CMV pp65, EBV-EBNA3c, гемагглютинирина вируса гриппа А (HA), GAD, PDL1, гуанилил циклазы С (GCC), белка KSHV-K8.1, белка KSHV-gH, аутоантитела к десмоглеину 3 (Dsg3), аутоантитела к десмоглеину 1 (Dsg1), HLA, HLA-A, HLA-A2, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, HLA-G, IgE, CD99, Ras G12V, тканевого фактора 1 (TF1), AFP, GPRC5D, Клаудина18.2 (CLD18A2 или CLDN18A.2), Р- гликопротеина, STEAP1, LIV1, нектин-4, Крипто, GPA33, BST1/CD157, хлоридного канала с низкой проводимостью и антигена, распознаваемого антителом TNT.

[0015] Данное изобретение также относится к способу лечения или профилактики заболевания, связанного с экспрессией ассоциированного с заболеванием антигена у субъекта, включающему введение субъекту эффективного количества иммунных эффекторных клеток, содержащих не встречающийся в природе иммунный рецептор и селективный активатор NF-кВ, при этом указанный не встречающийся в природе иммунный рецептор содержит антигенсвязывающие домены, которые связываются с ассоциированным с заболеванием антигеном, указанный ассоциированный с заболеванием антиген выбран из группы, состоящей из: CD5; CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS1 (также называется как подгруппа 1 CD2, CRACC, SLAMF7, CD319 и 19A24); лектиноподобной молекулы 1 С-типа (CLL-1 или CLECL1); CD33; рецептора эпидермального фактора роста, вариант III (EGFRviii); ганглиозида G2 (GD2); ганглиозида GD3 (aNeu5Ac (2-8), aNeu5Ac (2-3) bDGalp (1-4) bDGlcp (1-1) Cer); белка созревания В-клеток члена семейства рецепторов TNF (BCMA); антигена Tn ((Tn Ag) или (GalNAc α -Ser/Thr)); простат-специфического мембранного антигена (PSMA); рецепторного тирозинкиназоподобного орфанного рецептора 1 (ROR1); Fms подобной тирозинкиназы 3 (FLT3); связанного с опухолью гликопротеина 72 (TAG72); CD38; CD44v6; гликозилированного эпитопа CD43, экспрессируемого на клетках острого лейкоза или лимфомы, но не на гематопозитических предшественниках, гликозилированного эпитопа CD43, экспрессируемого на клетках негематопозитических раковых заболеваний, карциноэмбрионального антигена (CEA); молекулы адгезии эпителиальных клеток (EPCAM); B7H3 (CD276); KIT (CD117); субъединицы рецептора интерлейкина-13 альфа-2 (IL-13Ra2 или CD213A2); мезотелина; рецептора интерлейкина 11 альфа (IL-11Ra); антигена стволовых клеток простаты (PSCA); протеиназы серина 21 (тестизина или

PRSS21); рецептора сосудистого эндотелиального фактора роста 2 (VEGFR2); антигена Льюиса (Y); CD24; бета-рецептора фактора роста, полученного из тромбоцитов (PDGFR-бета); стадийно-специфического эмбрионального антигена-4 (SSEA-4); CD20; альфа-рецептора фолата; рецепторной тирозин-протеинкиназы ERBB2 (Her2/neu); муцина 1, связанного с клеточной поверхностью (MUC1); рецептора эпидермального фактора роста (EGFR); молекулы адгезии нервных клеток (NCAM); простазы; простатической кислотой фосфатазы (PAP); мутированного фактора удлинения 2 (ELF2M); эфрина B2; белка активации фибробластов альфа (FAP); рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (рецептора IGF-I), карбоангидразы IX (CAIX); субъединицы протеасомы (просомы, макропаина), бета-тип а, 9 (LMP2); гликопротеина 100 (gp100); слитого белка-онкогена, состоящего из кластерной области точки разрыва (BCR) и гомолога 1 вирусного онкогена мышинной лейкозы Абельсона (Abl) (bcr-abl); тирозиназы; рецептора 2 эфрина типа A (EphA2); фукозила GM1, молекулы адгезии сиалил Льюиса (sLe); ганглиозида GM3 (aNeu5Ac (2-3) bDCIalp (1-4) bDGlcP (1-1) Cer); трансглутаминазы 5 (TGS5); высокомолекулярного антигена, ассоциированного с меланомой (HMWMAA); о-ацетил-GD2 ганглиозида (OAcGD2); эндотелиального маркера 1 опухоли (TEM1/CD248); эндотелиального маркера 7 опухоли (TEM7R); клодина 6 (CLDN6); рецептора гормонов, стимулирующих щитовидную железу (TSHR); рецептора, связанного с G белком, класса C, группы 5, члена D (GPRC5D); открытая рамка считывания 61 хромосомы X (CXORF61); CD97; CD179a; киназы анапластической лимфомы (ALK); полисиаловой кислоты; специфичной для плаценты 1 (PLAC1); гексасахаридной части globoH гликоцерамида (GloboH); антигена дифференцировки молочной железы (NY-BR-1); уроплакина 2 (UPK2); клеточного рецептора вируса гепатита А 1 (HAVCR1); адренорецептора бета 3 (ADRB3); паннексина 3 (PANX3); G-белок-связанного рецептора 20 (GPR20); комплекса антигена 6 лимфоцитов, локуса К 9 (LY6K); обонятельного рецептора 51E2 (OR51E2); белка альтернативной рамки считывания TCR гамма (TARP); белка опухоли Вильмса (WT1); антигена 1 рака/яичка (NY-ESO-1); антигена 2 рака/яичка (LAGE-1a); ассоциированного с меланомой антигена 1 (MAGE-A1); вариантного гена 6 ETS транслокации, расположенного на хромосоме 12p (ETV6-OMJ); белка спермы 17 (SPA17); члена 1A семейства X антигенов (XAGE1); ангиопоэтинсвязывающего рецептора 2 клеточной поверхности (Tie 2); антигена-1 яичка рака меланомы (MAD-CT-1); антигена-2 яичка рака меланомы (MAD-CT-2); Fos-связанного антигена 1; опухолевого белка p53 (p53); мутанта p53; простерина; сурвивина; теломеразы; опухолевого антигена-1 рака карциномы простаты (PCT A-1 или Galectin 8), антигена 1 меланомы, распознаваемого Т-клетками (MelanA или MART1); мутанта крысиной саркомы (Ras); обратной транскриптазы теломеразы человека (hTERT); точек разрыва саркомы; ингибитора апоптоза меланомы (ML-IAP); ERG (ген слияния трансмембранной протеазы серина 2 (TMPRSS2), ETS); N-ацетилглюкозаминилтрансферазы V (NA17); белка с парными боксами Pax-3 (PAX3); андрогенного рецептора; циклина B1; гомолога, полученного из нейробластомы, вирусного онкогена v-трус птичьего миелоцитоматоза (MYCN); члена C

семейства Ras гомологов (RhoC); родственного тирозиназе белка 2 (TRP-2); цитохрома P450 1B 1 (CYP1B 1); подобного CCCTC-связывающему фактору (белку с цинковыми пальцами) (BORIS или брат регулятора сайтов импринтинга), антигена 3 плоскоклеточной карциномы, распознаваемого Т-клетками (SART3); белка с парными боксами Pax-5 (PAX5); проакрозин-связывающего белка sp32 (OY-TE51); лимфоцит-специфической протеинтирозинкиназы (LCK); якорного белка 4 киназы А (AKAP-4); Х точки разрыва 2 синовиальной саркомы (SSX2); рецептора конечных продуктов усиленного гликирования (RAGE-1); почечного повсеместного 1 (RU1); почечного повсеместного 2 (RU2); легумаина; вируса папилломы человека Е6 (HPV Е6); вируса папилломы человека Е7 (HPV Е7); кишечной карбоксилэстеразы; мутированного белка теплового шока 70-2 (mut hsp70-2); CD79a; CD79b; CD72; связанного с лейкоцитами иммуноглобулин-подобного рецептора 1 (LAIR1); Fc-фрагмента рецептора IgA (FCAR или CD89); члена 2 подгруппы А лейкоцитарного иммуноглобулиноподобного рецептора (LILRA2); член f семейства, подобного молекуле CD300 (CD300LF); член А семейства 12 доменов лектинов С-типа (CLEC12A); антигена 2 стромальных клеток костного мозга (BST2); белка 2 подобного EGF-подобный модуль-содержащему муцин-подобному рецептору гормонов (EMR2); лимфоцитарного антигена 75 (LY75); глипикана-3 (GPC3); Fc-рецепторо-подобного 5 (FCRL5); и иммуноглобулин лямбда-подобного полипептида 1 (IGLL1), MPL, биотина, с-МЫС эпителиального тэга, CD34, LAMP1 TROP2, GFRalpha4, CDH17, CDH6, NYBR1, CDH19, CD200R, SleA (CA19.9; антиген сиалила Льюиса); Фукозил-GM1, PTK7, gpNMB, CDH1-CD324, DLL3, CD276/B7H3, IL11Ra, IL13Ra2, CD179b-IGL1, ALK TCR гамма-дельта, NKG2D, CD32 (FCGR2A), CSPG4-HMW-MAA, Tim1-/HVCR1, CSF2RA (GMCSFR-альфа), TGFбетаP2, VEGFR2/KDR, Льюис антигена, цепи TCR-бета1, цепи TCR-бета2, цепи TCR-гамма, цепи TCR-дельта, FITC, рецептора леутенизирующего гормона (LHR), рецептора фолликулостимулирующего гормона (FSHR), рецептора гормона хорионического гонадотропина (CGHR), CCR4, SLAMF6, SLAMF4, гликопротеина оболочки HIV1, HTLV1-Tax, CMV pp65, EBV-EBNA3c, гемагглютинирина вируса гриппа А (HA), GAD, PDL1, гуанилил циклазы С (GCC), белка KSHV-K8.1, белка KSHV-gH, аутоантитела к десмоглеину 3 (Dsg3), аутоантитела к десмоглеину 1 (Dsg1), HLA, HLA-A, HLA-A2, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA -DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, HLA-G, IgE, CD99, Ras G12V, тканевого фактора 1 (TF1), AFP, GPRC5D, Клаудина18.2 (CLD18A2 или CLDN18A.2), Р- гликопротеина, STEAP1, LIV1, нектин-4, Крипто, GPA33, BST1/CD157, хлоридного канала с низкой проводимостью и антигена, распознаваемого антителом TNT, и тем самым лечение субъекта или предотвращение заболевания у субъекта. В другом или дополнительном варианте осуществления заболевание, связанное с экспрессией ассоциированного с заболеванием антигена, выбирают из группы, состоящей из пролиферативного заболевания, предракового состояния, рака и состояния, не связанного с раком, связанного с экспрессией ассоциированного с заболеванием антигена. В другом или дополнительном варианте осуществления рак представляет собой гематологический рак, выбранный из одного или большего количества из хронического лимфолейкоза

(ХЛЛ), острых лейкозов, острого лимфолейкоза (ОЛЛ), В-клеточного острого лимфолейкоза (В-ОЛЛ), острого Т-лимфолейкоза (Т-ОЛЛ), хронического миелогенного лейкоза (ХМЛ), В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, бластного плазматоидного новообразования дендритных клеток, лимфомы Беркитта, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, первичной эффузионной лимфомы, лимфомы лимфоцитов фолликулярных клеток, лимфомы мелкоклеточных клеток или крупноклеточной фолликулярной лимфомы, злокачественного лимфопролиферативного состояния, МАЛТ-лимфом, мантийно-клеточной лимфомы, лимфомы маргинальной зоны, множественной миеломы, миелодисплазии и миелодиспластического синдрома, неходжкинской лимфомы, лимфом Ходжкина, плазмабластных лимфом, новообразований плазмочитов дендритных клеток, макроглобулинемии Вальденстрема или прелейкоза. В другом или дополнительном варианте осуществления рак выбран из группы, состоящей из рака толстой кишки, рака прямой кишки, почечно-клеточного рака, рака печени, немелкоклеточного рака легкого, рака тонкой кишки, рака пищевода, меланомы, рака костей, рака поджелудочной железы, рака кожи, рака головы или шеи, злокачественной или внутриглазной злокачественной меланомы, рака матки, рака яичников, рака прямой кишки, рака анальной области, рака желудка, рака яичка, рака матки, рака фаллопиевых труб матки, рака эндометрия, рака шейки матки, рака влагалища, рака вульвы, болезни Ходжкина, неходжкинской лимфомы, рака эндокринной системы, рака щитовидной железы, рака паращитовидной железы, рака надпочечника, саркомы мягких тканей, рака мочеиспускательного канала, рака полового члена, твердых опухолей детского возраста, рака мочевого пузыря, рака почки или мочеточника, рака почечной лоханки, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), первичной лимфомы ЦНС, опухоли ангиогенеза, опухоли оси позвоночника, глиомы ствола головного мозга, аденомы гипофиза, саркомы Капоши, рака Меркеля, рака эпидермоида, плоскоклеточного рака, лимфомы Т-клеток, рака, вызванного окружающей средой, комбинаций указанных видов рака, и метастатические поражения указанных видов рака. В другом или дополнительном варианте осуществления заболевание связано с заражением вирусом, включая, но не ограничиваясь ими, HIV1, ВИЧ2, HTLV1, вирус Эпштейна-Барра (EBV), цитомегаловирус (CMV), аденовирус, адено-ассоциированный вирус, вирус ВК, герпесвирус 6 человека, герпесвирус 8 человека, вирус гриппа, вирус парагриппа, вирус птичьего гриппа, коронавирусы MERS и SARS, вирус Конго-Крымской геморрагической лихорадки, рино вирус, энтеровирус, вирус Денге, вирус Западного Нила, вирус Эбола, вирус Марбург, вирус лихорадки Ласса, Зика вирус, RSV, вирус кори, вирус паротита, риновирус, вирус ветряной оспы, вирус простого герпеса 1 и 2, вирус ветряной оспы, HIV-1, HTLV1, вирус гепатита, энтеровирус, вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирусы лихорадки Нипах и долины Рифт, вирус японского энцефалита, полиомавирус клеток Меркеля или ассоциировано с инфекцией микобактерий туберкулеза, атипичных видов микобактерий, *Pneumocystis jirovecii*, токсоплазмозом, риккетсией, нокардией, аспергиллюсом, мукомом или кандидозом. В другом или дополнительном варианте

осуществления заболевание представляет собой иммунное или дегенеративное заболевание, включающее, но не ограничивающееся этим, сахарный диабет, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, пузырчатку обыкновенную, анкилозирующий спондилит, тиреодит Хашимото, СКВ, саркоидоз, склеродерму, заболевание смешанной соединительной ткани, болезнь трансплантат против хозяина или болезнь Альцгеймера.

[0016] Детали одного или большего количества вариантов осуществления данного изобретения изложены на прилагаемых чертежах и в описании ниже. Другие признаки, объекты и преимущества изобретения будут очевидны из описания и графических материалов, а также из формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0017] **Фиг. 1** демонстрирует антитело, Т-клеточный рецептор (TCR), CAR и CAR и SIR следующего поколения.

[0018] **Фиг. 2** демонстрирует сравнение биологической активности и структуры второго поколения CAR с одним из вариантов осуществления данного изобретения, путем демонстрация CAR без CD28 или 41BB, но экспрессирующего NF-κB стимулирующую молекулу (NEMO и/или K13, или их мутант).

[0019] **Фиг. 3** демонстрирует сильную активацию NF-κB с помощью мутантов mNEMO-K270A, hNEMO-K277A и слабую активацию с помощью мутантов hNEMO-K277I и hNEMO-K277G.

[0020] **Фиг. 4** демонстрирует активности биспецифической ловушки Т клеток нацеленной на MPL (myeloproliferative leukemia protein) и использующей нацеливающий домен 161-scFv. HEL-pLenti-hGluc и Т клетки предварительно инкубировали отдельно со следующими супернатантами при 4°C в течение 2 ч: только средой и Plenti-161-StreptagII-CD3-Мус-His-P02 (042517-P02-SC). После инкубации клетки совместно культивировали в 96-луночном планшете с U-образным дном в соотношении Е: Т 1: 1 или 5: 1 в течение 4 часов при 37°C. 50 мкл клеток+супер./лунку переносили в 384-луночный планшет в трех экземплярах. Анализ hGluc проводили с использованием 15 мкл буфера для анализа CTZ (1: 100).

[0021] **На Фиг. 5А-С** продемонстрировано CRISPR/Cas9-опосредованное нацеливание гена TFP в локус TRAC и стратегии по сохранению экспрессии TRAC. А) Вверху локус TRAC с 5'-концом (серый) первого экзона TRAC, TRAC нРНК (синий) и соответствующая последовательность PAM (красный). Две синие стрелки указывают на предсказанный двойной разрыв Cas9. Внизу - интеграция с помощью CRISPR/Cas9 в локус TRAC. Нацеливающая конструкция (AAV) содержит акцептор сплайсинга (SA), за которым следует кодирующая последовательность F2A, ген TFP и последовательность полиА, фланкированные последовательностями, гомологичными локусу TRAC (LHA и RHA, левое и правое плечо гомологии). После интеграции эндогенный промотор TCRα управляет экспрессией TFP, в то время как локус TRAC нарушается. В) Нацеливающая конструкция экспрессирует TFP и коэкспрессирует TRAC (константную цепь TCRα) через последовательность 2A. С) Нацеливающая конструкция экспрессирует TFP и

коэкспрессирует через последовательность 2A сигнальный пептид, который находится в рамке считывания с первым экзоном, присутствующим в RHA, так что промотор TCR α управляет экспрессией TFP, а также TRAC, в котором отсутствует вариабельная область TCR α (TRAV); TRAJ, область присоединения TCR α ; 2A, самоотщепляющаяся последовательность 2A. pA: последовательность полиА SV40/ β -глобина.

[0022] **На Фиг. 6A-E** продемонстрированы различные варианты конструкций для нацеливающей кассеты для направления Ab-TCR в локус TRAC.

[0023] **На Фиг. 7A-F** продемонстрированы различные варианты конструкций для нацеливающей кассеты для направления cTCR (SIR) в локус TRAC.

[0024] **На Фиг. 8A-D** продемонстрированы различные варианты конструкций для нацеливающей кассеты для направления cTCR (SIR) и TCR в локус TRAC.

[0025] **На Фиг. 9A-D** продемонстрированы различные варианты конструкций для нацеливающей кассеты для направления одноцепочечной cTCR (SIR) в локус TRAC.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0026] Первоначальные CAR первого поколения были сконструированы путем слияния антигенсвязывающего домена на основе scFv (одноцепочечный вариабельный фрагмент) с инертным трансмембранным доменом CD8, связанным с цитоплазматическим сигнальным доменом, происходящим из CD3- ζ или γ -цепей Fc-рецептора (**Фиг. 1**).

[0027] Хотя агрегация цепей CD3- ζ достаточна для обеспечения литической активности Т-клеток, они не смогли вызвать устойчивый ответ цитокинов, включая интерлейкин-2 (IL-2), и поддержание экспансии Т-клеток при повторном воздействии антигена. Для оптимальной активации и пролиферации Т-клеткам требуется как связывание с Т-клеточным рецептором и передача сигналов Т-клеточным рецептором, так и костимуляторная передача сигналов через костимуляторные рецепторы (*т.е.* CD28, 4-1BB, OX-40) на Т-клетках, которые связываются с когнатными лигандами (*т.е.* CD80/86, 4-1BBL, OX-40L), которые экспрессируются либо опухолевыми клетками-мишенями, либо антигенпрезентирующими клетками. Чтобы преодолеть недостаток костимуляции Т-клеток, CAR первого поколения были дополнительно модифицированы путем включения цитоплазматических сигнальных доменов костимуляторных рецепторов Т-клеток. Эти CAR второго поколения повышают интенсивность передачи сигналов и устойчивость измененных Т-клеток, что приводит к превосходной противоопухолевой активности. Передача сигналов через костимуляторные домены, присутствующие в конструкциях CAR 2-го поколения, приводит к активации нескольких сигнальных путей, таких как NF- κ B, АКТ и ERK. В частности, активация АКТ способствует активации Т-клеток, но также было продемонстрировано, что она приводит к терминальной дифференцировке, истощению и отсутствию персистенции.

[0028] **Фиг.2** изображает CAR 2-го поколения, как описано выше, рядом с CAR первого поколения с добавлением специфической NF- κ B стимулирующей молекулы, с изображением биологической активности, связанной с каждой.

[0029] Конструкции CAR в современном клиническом использовании являются

искусственными по конструкции, поскольку они представляют собой слияние нескольких различных белков. В частности, включение костимуляторного домена в конструкцию CAR 2-го поколения приводит к нефизиологической передаче сигналов через рецептор, что, в свою очередь, может способствовать их токсичности. Некоторые CAR демонстрируют тоническую антиген-независимую передачу сигналов, что приводит к неограниченной клеточной активации, что в конечном итоге приводит к апоптозу, избыточному выделению цитокинов независимо от родственных антигенов и иммунологическому истощению. Тоническая передача сигналов через костимуляторные домены (*например*, домены 41BB и CD28), как было продемонстрировано, препятствует выживанию Т-клеток. Таким образом, существует необходимость в улучшении дизайна CAR для достижения долгосрочной персистенции модифицированных CAR Т-клеток без риска чрезмерной токсичности, такой как синдром высвобождения цитокинов (CRS - cytokine release syndrome).

[0030] Чтобы преодолеть некоторые ограничения в конструкции обычных CAR 2-го поколения, несколько альтернативных конструкций, которые получили название CAR следующего поколения, были описаны, в том числе Ab-TCR (WO 2017/070608 A1, включена в данное описание в качестве ссылки), слитых белков TCR рецептора или TFP (WO 2016/187349 A1, включена в данный документ в качестве ссылки), синтетические иммунные рецепторы (SIR) (см. WO 2018/102795 A1, включена в данный документ в качестве ссылки), трифункциональный спариватель Т-клеточных антигенов (Tri-TAC (Tri-functional T cell antigen coupler)) (см., WO 2015/117229 A1, включенной в данный документ в качестве ссылки). Эти альтернативные конструкции CAR, как правило, не имеют костимулирующей области.

[0031] Чтобы преодолеть ограничения активации АКТ и тонической передачи сигналов, это раскрытие демонстрирует использование селективных активаторов NF-κB, таких как NEMO-мутанты (*например*, hNEMO-K277A, hNEMO-K277A-DeltaV249-K255, мышь NEMO-K270A), K13-opt, IKK2-S177E-S181E или IKK1-S176E-S180E, для обеспечения костимулирующей функции. В отличие от костимуляторных доменов, происходящих из 41BB и CD28, которые активируют множество сигнальных путей (см. CAR 2-го и 3-го поколения на **Фиг. 1**), селективных активаторов NF-κB, таких как, *например*, hNEMO-K277A, hNEMO-K277A-DeltaV249-K255, мышь NEMO-K270A, K13-opt, IKK2-S177E-S181E или IKK1-S176E-S180E, избирательно активировать NF-κB путь путем активации комплекса I-карраВ - киназы (ИКК). Данное раскрытие далее описывает альтернативную конструкцию не встречающегося в природе иммунного рецептора, *например*, CAR, в которой костимуляция обеспечивается с помощью вспомогательного модуля, содержащего селективный NF-κB активатор, который экспрессируется совместно с неприродным иммунным рецептором (*например*, CAR). Однако, в отличие от конструкций CAR 2-го поколения, в которых костимуляторный домен является компонентом зрелого полипептида CAR, вспомогательный модуль, содержащий селективный активатор NF-κB, необязательно является неотъемлемой частью

полипептида зрелого иммунного рецептора, *например*, CAR. Такая конструкция имеет преимущество, так как она преодолевает проблемы передачи тонических сигналов, чрезмерной продукции цитокинов и раннего истощения Т-клеток, вызванных агрегацией и нефизиологической передачей сигналов через костимуляторные домены. Данное раскрытие изобретения дополнительно обеспечивает способ регулирования активности активаторов NF-κB путем экспрессии их в слиянии с доменами-переключателями, *например*, в слиянии с тандемными копиями домена FKBP12v36.

[0032] Данное раскрытие демонстрирует, что экспрессия селективных активаторов NF-κB, таких как, *например*, hNEMO-K277A, hNEMO-K277A-DeltaV249-K255, мышинный NEMO-K270A, IKK2-S177E-S181E, IKK1-S176-S180E и K13-opt и в Т клетках расширяет их способность к длительной пролиферации в культуре, без старения, тем самым впервые демонстрируя, что активации одного пути (*т. е.* NF-κB) достаточно для отсрочки старения Т-клеток. *Например*, конструкции CD19-CAR, коэкспрессирующие hNEMO-K277A или hNEMO-K277A-DeltaV249-K255, но лишённые какого-либо костимуляторного домена, демонстрируют превосходную эффективность *in vivo* по сравнению с конструкцией CAR 2-го поколения, содержащей костимуляторный домен 41BB. Данное раскрытие дополнительно демонстрирует, что селективная активация NF-κB является достаточной для стимулирования пролиферации Т-клеток, задержки старения и улучшения характеристик Т-клеток для адаптивной клеточной терапии, включая клеточную терапию CAR-T. Таким образом, данное изобретение обеспечивает композицию и способы для повышения выживаемости, пролиферации, секреции цитокинов, задержки истощения и старения и улучшения экспансии *in vivo*, персистенции и противоопухолевой активности иммунной клетки, *например* Т клетки, *например* CAR-T или TCR-T или SIR-T-клетки, и/или иммунной клетки, экспрессирующих не встречающийся в природе иммунный рецептор, посредством селективной или преимущественной (*т.е.* без активации АКТ) активации пути NF-κB в иммунной клетке. Кроме того, раскрытие демонстрирует, что использование селективных активаторов NF-κB, таких как, *например*, hNEMO-K277A или hNEMO-K277A-DeltaV249-K255, не ограничивается их использованием в клетках CAR-T, поскольку их можно использовать для любых Т-клеток для адаптивной клеточной терапии, включая Т клетки, экспрессирующие эндогенный TCR (*например*, инфильтрирующие опухоль лимфоциты), экзогенный TCR, SIR и тому подобное.

[0033] Данное раскрытие дополнительно демонстрирует, что селективные активаторы NF-κB, такие как, *например*, hNEMO-K277A, hNEMO-K277A-DeltaV249-K255, мышинный NEMO-K270A, K13-opt, IKK2-S177E-S181E или IKK1-S176E-S180E, могут использоваться для повышения эффективности вакцин путем стимулирования секреции цитокинов и презентации антигена иммунными клетками, *например* антигенпрезентирующими клетками, *например* дендритными клетками. *Например*, дендритные клетки (ДК), полученные из костного мозга, экспрессирующие селективные активаторы NF-κB, такие как hNEMO-K277A, hNEMO-K277A-DeltaV249-K255, мышинный NEMO-K270A, K13-opt, IKK2-S177E-S11 или IKK1-S176E-S180E, демонстрируют

превосходную продукцию цитокинов, презентацию антигена и иммунный ответ (*например*, противоопухолевый ответ или ответ против инфекционного агента) по сравнению с контрольными ДК.

[0034] Данное раскрытие дополнительно предоставляет активаторы NF-κB, включая селективные активаторы NF-κB, которые имеют человеческое происхождение и, следовательно, являются менее иммуногенными.

[0035] Данное раскрытие далее предоставляет активаторы NF-κB, включая селективные активаторы NF-κB, которые могут экспрессироваться в цитозоле. Данное раскрытие дополнительно предоставляет активаторы NF-κB, включая селективные активаторы NF-κB, которые являются конститутивно активными и не требуют стимула, *например*, лечения лигандом, для их способности активировать NF-κB.

[0036] Далее раскрыто несколько антигенсвязывающих доменов, которые можно использовать при создании обычных CAR (*например*, CAR 2-го поколения, содержащего костимулирующий домен 41BB), а также CAR следующего поколения, такие как SIR, zSIR, Ab-TCR и TFP, для применений в адаптивной клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления эти антигенсвязывающие домены получены из антител и антигенов-мишеней, экспрессируемых как в гематологических злокачественных новообразованиях, так и в твердых опухолях. SEQ ID NO фрагментов vL, vH и scFv этих антигенсвязывающих доменов продемонстрированы в **Таблицах 6А-С**. SEQ ID NO определяющих комплементарность областей (CDR) легкой (vL) и тяжелой (vH) цепей продемонстрированы в **Таблицах 6А-В**. SEQ ID нуклеиновых кислот и аминокислот иллюстративных CAR 2-го поколения, содержащих 41BB костимуляторные домены и CAR следующего поколения (*например*, zCAR-K13, zCAR-NEMO-K277A, SIR, Ab-TCR и TFP) на основе этих антигенсвязывающих доменов продемонстрированы в **Таблицах 10-14**. CAR, содержащие эти антигенсвязывающие домены, проявляют различные свойства *in vitro* и *in vivo*, такие как сродство связывания с антигенами-мишенями, секреция цитокинов, пролиферация, цитотоксичность, истощение и длительная персистенция. Как таковые, не встречающиеся в природе иммунные рецепторы, *например*, CAR, содержащие эти антигены-мишени, могут быть применены для генерирования разнообразного иммунного ответа. Полинуклеотиды, полипептиды, экспрессирующие конструкции, рекомбинантно сконструированные клетки, экспрессирующие CAR, содержащие антигенсвязывающие домены по данному изобретению, а также способы получения и использования таких полипептидов, полинуклеотидов и клеток описаны в способах, известных в данной области, и в способах, описанных в РСТ/US2017/024843, WO 2014/160030 A2, WO 2016/187349 A1, WO 2017/070608 A1 и WO 2018/102795 A1, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Иммунные клетки, экспрессирующие CAR, содержащие эти антигенсвязывающие домены, можно генерировать и использовать для адаптивной клеточной терапии рака, инфекционных и иммунных нарушений с использованием способов, известных в данной области техники, и способов, описанных в WO 2017/070608 A1, WO 2016/187349 A1, WO 2018/102795 A1,

WO 2015/117229 A1, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0037] Данное раскрытие дополнительно предоставляет новые способы для генерации аллогенных Т-клеток, экспрессирующих TCR и CAR, включая CAR следующего поколения (*например*, TFP, SIR, Ab-TCR, cTCR), для цели готовой к употреблению адаптивной клеточной терапии.

[0038] Данное раскрытие дополнительно обеспечивает новые способы комбинированной терапии с использованием аутологичных и аллогенных Т-клеток, экспрессирующих TCR и CAR, включая CAR следующего поколения (*например*, TFP, SIR, Ab-TCR и cTCR). Данное изобретение относится к способам восстановления экспрессии и/или активности TFP на основе цепей CD3 ϵ , CD3 γ и CD3 δ в Т клетках, в которых отсутствует экспрессия нативных цепей TCR α , TCR β , TCR γ или TCR δ , путем совместной экспрессии в клетках, экспрессирующих TFP, константных цепей TCR α , TCR β , TCR γ или TCR δ . Данное раскрытие далее предоставляет способы восстановления экспрессии и/или активности TFP на основе цепей CD3 ϵ , CD3 γ и CD3 δ в Т-клетках, в которых отсутствует экспрессия нативных цепей TCR α , TCR β , TCR γ или TCR δ , путем совместной экспрессии в клетках, экспрессирующих TFP, либо SIR, либо Ab-TCR, которые кодируют полноразмерные или фрагменты константных цепей TCR α , TCR β , TCR γ или TCR δ . Данное раскрытие изобретения предусматривает, что TFP на основе цепей CD3 ϵ , CD3 γ и CD3 δ можно комбинировать с SIR или Ab-TCR, кодирующими константные цепи цепей TCR α , TCR β , TCR γ или TCR δ в Т-клетках, в которых отсутствуют нативные цепи TCR α , TCR β , TCR γ или TCR δ с целью аллогенной и готовой к употреблению терапии.

[0039] Как используется в данном документе и в прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа (англ. «a», «an» и «the») включают множественное число, если контекст явно не предписывает иное. Таким образом, например, упоминание «клетки» включает в себя множество таких клеток, а ссылка на «полинуклеотид» включает ссылку на один или большее количество полинуклеотидов и так далее.

[0040] Кроме того, использование «или» означает «и/или», если не указано иное. Аналогично, слова «содержит», «содержат», «содержащие», «включают», «включает» и «включающий» являются взаимозаменяемыми и не предназначены для ограничения.

[0041] Кроме того, следует понимать, что в тех случаях, когда в описании различных вариантов осуществления используется термин «содержащий», специалистам в данной области техники должно быть понятно, что в некоторых конкретных случаях вариант осуществления может быть альтернативно описан с использованием языка «состоящий по существу из» или «состоящий из». »

[0042] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится данное изобретение. OJLen et al, Remington: The Science Practice of Pharmacy 22nd ed., Pharmaceutical Press (September 15, 2012); Hornyak et

al, Introduction to Nanoscience Nanotechnology, CRC Press (2008); Singleton Sainsbury, Dictionary of Microbiology Molecular Biology 3rd ed., revised ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2006); Smith, March 's Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms Structure 7th ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2013); Singleton, Dictionary of DNA Genome Technology 3rd ed., Wiley-Blackwell (November 28, 2012); Green Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2012) предоставляют специалисту в данной области общее руководство по многим терминам, используемым в данной заявке. Ссылки на то, как приготовить антитела, см. в Greenfield, Antibodies A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor NY, 2013); Kohler Milstein, Derivation of specific antibody-producing tissue culture tumor lines by cell fusion, Eur. J. Immunol. 1976 Jul, 6(7):511-9; Queen Selick, Humanized immunoglobulins, U. S. Patent No. 5,585,089 (1996 Dec); Riechmann et al, Reshaping human antibodies for therapy, Nature 1988 Mar 24, 332(6162): 323-7. Все заголовки и подзаголовки, приведенные в этих ссылках, предназначены исключительно для удобства чтения и не должны рассматриваться как ограничивающие данное изобретение. Хотя способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, могут использоваться при практическом применении или испытании изобретения, подходящие способы и материалы описаны ниже. Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылки, упомянутые в данном документе, включены в качестве ссылки во всей их полноте. В случае конфликта данное описание, включая определения, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, методы и конкретные примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения.

[0043] Все публикации в данном документе включены посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или заявка на патент была конкретно и индивидуально указана для включения в качестве ссылки. Любые цитируемые ссылки не являются признанием того, что какая-либо информация, представленная в них, является предшествующим уровнем техники или имеет отношение к заявленному в настоящее время изобретению, или что любая публикация, на которую конкретно или неявно ссылаются, является предшествующим уровнем техники.

[0044] Термин «примерно/около», когда он относится к измеряемому значению, такому как величина, временная длительность и т. п., подразумевает, что он охватывает колебания $\pm 20\%$ 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 указанного значения, поскольку такие вариации являются подходящими для выполнения раскрытых способов или описания композиций, приведенных в данном документе. Более того, любое значение или диапазон (*например*, менее 20 или аналогичная терминология) явно включают любое целое число между такими значениями или вплоть до значения. Таким образом, например, «от одной до пяти мутаций» явно включает в себя 1, 2, 3, 4 и/или 5 мутаций.

[0045] Термин «Ab-TCR» или «AbTCR» относится к платформе CAR следующего поколения, как описано в WO 2017/070608 A1, которая включена в данный документ

посредством ссылки. В одном варианте осуществления Ab-TCR содержит фрагмент антитела, который специфически связывается с целевым антигеном, слитым с модулем TCR, способным рекрутировать по меньшей мере один сигнальный модуль TCR. Иллюстративные модули TCR, которые можно использовать при создании Ab-TCR, представлены в SEQ ID NO: 959-964 (**Таблица 6D**) и в WO 2017/070608 A1, которая включена в данный документ посредством ссылки. В модуле TCR TCRb-IAH-6MD три аминокислотных остатка (F133, E136 и Q139), обнаруженные в цепи TCRb человека (SEQ ID NO: 15053) (см. **Таблицы 4, 5 и 6D**), мутированы в остатки изолейцин, аланин, и гистидин, обнаруженный в мышинной цепи TCRb, соответственно, для усиления экспрессии этого модуля. Аналогично, в модуле TCR IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD четыре аминокислотных остатка (P91, E92, S93, S94), обнаруженные в цепи TCRA человека (SEQ ID NO: 15041), мутируют с остатками S, D, V, P обнаружен в мышинной цепи TCRA для усиления экспрессии этого модуля (см. **Таблицы 3 и 6D**). Иллюстративные Ab-TCR, совместно экспрессирующие вспомогательный модуль, кодирующий NEMO-K277A, представлены в SEQ ID NO: 3124-3523 (**Таблица 14**). Однако вспомогательный модуль, кодирующий NEMO-K277A, не является обязательным. Ab-TCR с антигенсвязывающими доменами (*т. е.* фрагментами vL и vH, лигандами и рецепторами *и т.д.*), описанными в данном раскрытии, могут быть сконструированы без NEMO-K277A. Таким образом, этот вспомогательный модуль вместе с вышестоящей последовательностью Furine-SGSG-F2A может быть удален из Ab-TCR. В качестве альтернативы, вспомогательный модуль, кодирующий NEMO-K277A могут быть заменены вспомогательными модулями, кодирующие другие белки, такие как hNEMO-K277A-deltaV249-K555, mNEMO-K270A, K13-opt, IKK2-S177E-S181E или IKK1-S176E-S180E и MyD88 -L265P, FKBPx2-NEMO, NEMO-L600-FKBPx2 *и т. д.* Кроме того, модули TCR, присутствующие в Ab-TCR, могут быть заменены другими модулями TCR, описанными в WO 2017/070608 A1. Например, Ab-TCR, представленный SEQ ID NO: 3124-3323, содержит модули TCR IgCL-TCRb-IAH-6MD (SEQ ID NO: 960) и IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD (SEQ ID NO: 963) которые могут быть замещены модулями TCR IgCL-TCRb-wt2-opt-6MD (SEQ ID NO: 961) и IgG1-CH1-TCRa-wt2-opt-6MD (SEQ ID NO: 964), соответственно. Представлены иллюстративные Ab-TCR, совместно экспрессирующие вспомогательный модуль, кодирующий NEMO-K277A и содержащий модули TCR IgCL-TCRg-6MD (SEQ ID NO: 959) и IgG1-CH1-TCRd-6MD (SEQ ID NO: 962) в SEQ ID NO: 3324-3523. Порядок антигенсвязывающих доменов в этих конструкциях такой же, как порядок конструкций, продемонстрированных в Таблице 14, и, следовательно, Ab-TCR на основе IgCL-TCRg-6MD (SEQ ID NO: 959) и IgG1-CH1-TCRd-6MD (SEQ ID NO: 962) ориентирующийся на конкретный антиген и содержащий специфический антиген - связывающий домен может быть идентифицирован со ссылкой на **Таблицу 14**.

[0046] Термин «вспомогательный модуль» относится к любому одному или нескольким из hNEMO-K277A (или NEMO-K277A), hNEMO-K277A-delta-V249-K555, mNEMO-K270A, K13-opt, IKK2-S177E-S181E (или IKK2-SS/EE) I, IKK1-S176E-S180E

(или IKK1-SS/EE), MyD88-L265P, TCL-1a, MTCP-1, CMV-141, 41BBL, CD40L, vFLIP-K13, MC159, cFLIP-L/MRIT α , cFLIP-p22, HTLV1 Tax, HTLV2 Tax, мутант HTLV2 Tax-RS, FKBPx2-K13 Tax, FKBPx2-HTLV2-Tax, FKBPx2-HTLV2-Tax-RS 304, IL6 -vHH-Alb8-vHH, IL12f, PD1-4H1 scFV, PD1-5C4 scFV, PD1-4H1-Alb8-vHH, PD1-5C4-Alb8-vHH, CTLA4-Ipilimumab-scFv, CTLA4-Ipilimumab-Alb8-vHH, IL-6 -19A-scFV, IL6-19A-scFV-Alb8-vHH, sHVEM, sHVEM-Alb8-vHH, hTERT, Fx06, кшРНК, нацеленные на Brd4, IgSP-, IgSP- и их комбинации, которые экспрессируются в иммунной клетке (*например*, Т-клетке, *например*, CAR-Т-клетке или TCR-Т-клетке) для снижения, регулирования или модификации активности иммунной клетки. В некоторых вариантах осуществления вспомогательный модуль коэкспрессируется с иммунным рецептором, таким как CAR или TCR, для увеличения, уменьшения, регулирования или модификации экспрессии или активности CAR или TCR или CAR-экспрессирующей или TCR-экспрессирующей клетки. Вспомогательный модуль может быть совместно экспрессирован с CAR или TCR с использованием одного вектора или с использованием двух или более различных векторов. В дополнительном варианте осуществления вспомогательный модуль содержит FKBP (FK506-связывающий белок) -слитый белок, такой как FKBPx2-NEMO, активность которого можно контролировать путем введения молекулы димеризатора. В некоторых вариантах осуществления вспомогательный модуль экспрессируется в антигенпрезентирующей клетке, *например* в дендритной клетке.

[0047] Используемый в данном документе термин «средство» предназначен для описания меры прочности связывания. Средство в некоторых случаях зависит от близости стереохимического соответствия между связывающим агентом и его мишенью (*например*, между антителом и антигеном, включая эпитопы, специфичные для связывающего домена), от размера области контакта между ними и от распределение заряженных и гидрофобных групп. «Аффинность» обычно относится к способности связывающего агента связывать свою мишень. В данной области существует множество способов измерения «аффинности». Например, в данной области известны способы расчета аффинности антитела к антигену, включая использование экспериментов по связыванию для расчета аффинности. Аффинность связывания может быть определена с использованием различных методов, известных в данной области, например, поверхностного плазмонного резонанса, биослойной интерферометрии, двухполяризационной интерферометрии, статического рассеяния света, динамического рассеяния света, калориметрии изотермического титрования, ИФА, аналитического ультрацентрифугирования и проточной цитометрии. Иллюстративный способ определения аффинности связывания использует поверхностный плазмонный резонанс. Поверхностный плазмонный резонанс представляет собой оптическое явление, позволяющее анализировать биоспецифические взаимодействия в реальном времени путем обнаружения изменений концентраций белка в матрице биосенсора, например, с использованием системы VIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Упсала, Швеция и Пискатауэй, Нью-Джерси). Как использовано в данном описании, термин «специфическое связывание»

означает, что контакт между антителом и антигеном происходит с аффинностью связывания по меньшей мере 10^{-6} М. В некоторых аспектах антитела связываются с аффинностью по меньшей мере, приблизительно 10^{-7} М, и предпочтительно от 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М, или 10^{-12} М.

[0048] Используемый в данном документе «путь АКТ» или «путь PI3K-АКТ» представляет собой путь передачи сигнала, который способствует выживанию и росту в ответ на внеклеточные сигналы. Ключевыми вовлеченными белками являются PI3K (фосфатидилинозитол-3-киназа) и Akt (протеинкиназа В).

[0049] Используемый в данном документе термин «антитело» относится к белковой или полипептидной последовательности, полученной из молекулы иммуноглобулина, которая специфически связывается с антигеном. Антитела могут быть моноклональными или поликлональными, многоцепочечными или одноцепочечными или интактными иммуноглобулинами и могут быть получены из природных источников или из рекомбинантных источников. Антитела могут быть тетрамерами молекул иммуноглобулина. Антитело может быть «гуманизированным», «химерным» или нечеловеческим.

[0050] Термин «фрагмент антитела» относится по меньшей мере к одной части антитела, которая сохраняет способность специфически взаимодействовать (*например*, путем связывания, стерического затруднения, стабилизации/дестабилизации, пространственного распределения) с эпитопом антигена. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, Fab, Fab', F(ab'), фрагменты Fv, фрагменты антител scFv, дисульфид-связанные Fv (sdFv), фрагменты Fd, состоящие из доменов VH и CH1, линейные антитела, однодоменные антитела (sdAb), такие как vL или vH, vHH домены верблюдовых, мультиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител, таких как двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области, и изолированную CDR или другие эпитоп-связывающие фрагменты антитела. Антигенсвязывающий фрагмент также может быть включен в однодоменные антитела, макси-тела, мини-тела, нанотела, интратела, диатела, триатела, тетратела, v-NAR и bis-scFv (см., *например*, Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology 23: 1126-1136, 2005). Антигенсвязывающие фрагменты также могут быть привиты в каркасы на основе полипептидов, таких как фибронектин типа III (Fn3) (см. Патент США № 6703199, в котором описаны мини-тела полипептида фибронектина).

[0051] Термин «тяжелая цепь антитела» относится к большему из двух типов полипептидных цепей, присутствующих в молекулах антитела в их естественных конформациях, и который обычно определяет класс, к которому относится антитело.

[0052] Термин «легкая цепь антитела» относится к меньшему из двух типов полипептидных цепей, присутствующих в молекулах антитела в их естественных конформациях. Легкие цепи каппа (κ) и лямбда (λ) относятся к двум основным изотипам легкой цепи антитела.

[0053] «Противораковый агент» относится к агентам, которые ингибируют

аберрантное деление и рост клеток, ингибируют миграцию опухолевых клеток, ингибируют инвазивность или предотвращают рост и метастазирование рака. Термин включает химиотерапевтические агенты, биологический агент (*например*, микроРНК, вирусные векторы, такие как сконструированный MLV, аденовирусы, вирус герпеса, доставляющий цитотоксические гены), антитела и тому подобное.

[0054] Термин «противораковый эффект» относится к биологическому эффекту, который может проявляться различными способами, включая, но не ограничиваясь ими, уменьшение объема опухоли, уменьшение количества раковых клеток, уменьшение количества метастазов, увеличение в ожидаемой продолжительности жизни, уменьшении пролиферации раковых клеток, уменьшении выживаемости раковых клеток или ослаблении различных физиологических симптомов, связанных с раковым состоянием. «Противораковый эффект» может также проявляться в способности CAR в первую очередь предотвращать возникновение рака.

[0055] Термин «антиген» или «Ag» относится к молекуле, которая вызывает иммунный ответ. Этот иммунный ответ может включать либо выработку антител, либо активацию специфических иммунологически компетентных клеток, или то и другое. Специалист в данной области поймет, что любая макромолекула, включая практически все белки или пептиды, может служить антигеном. Кроме того, антигены могут быть получены из рекомбинантной или геномной ДНК. Специалист в данной области поймет, что любая ДНК, которая содержит нуклеотидные последовательности или частичную нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, который вызывает иммунный ответ, следовательно, кодирует «антиген», как этот термин используется в данном документе. Кроме того, специалист в данной области поймет, что антиген не должен кодироваться исключительно нуклеотидной последовательностью гена полной длины. Данное раскрытие включает, но не ограничивается этим, использование частичных нуклеотидных последовательностей более чем одного гена и то, что эти нуклеотидные последовательности расположены в различных комбинациях для кодирования полипептидов, которые вызывают желаемый иммунный ответ. Кроме того, специалист в данной области поймет, что антиген вообще может не кодироваться «геном». Очевидно, что антиген может быть синтезирован или может быть получен из биологического образца или может быть макромолекулой помимо полипептида. Такой биологический образец может включать, но не ограничивается этим, образец ткани, образец опухоли, клетку или жидкость с другими биологическими компонентами.

[0056] Неограничивающие примеры целевых антигенов включают группу состоящую из: CD5; CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS1 (также называется как подгруппа 1 CD2, CRACC, MPL, SLAMF7, CD319 и 19A24); лектиноподобной молекулы 1 С-типа (CLL-1 или CLECL1); CD33; рецептора эпидермального фактора роста, вариант III (EGFRviii); ганглиозида G2 (GD2); ганглиозида GD3 (aNeu5Ac (2-8), aNeu5Ac (2-3) bDGalp (1-4) bDGlcsp (1-1) Cer); белка созревания В-клеток члена семейства рецепторов TNF (BCMA); антигена Tn ((Tn Ag) или (GalNAc α -Ser/Thr)); простат-специфического

мембранного антигена (PSMA); рецепторного тирозинкиназоподобного орфанного рецептора 1 (ROR1); Fms подобной тирозинкиназы 3 (FLT3); связанного с опухолью гликопротеина 72 (TAG72); CD38; CD44v6; гликозилированного эпитопа CD43, экспрессируемого на клетках острого лейкоза или лимфомы, но не на гематопоэтических предшественниках, гликозилированного эпитопа CD43, экспрессируемого на клетках негематопоэтических раковых заболеваний, карциноэмбрионального антигена (CEA); молекулы адгезии эпителиальных клеток (EPCAM); B7H3 (CD276); KIT (CD117); субъединицы рецептора интерлейкина-13 альфа-2 (IL-13Ra2 или CD213A2); мезотелина; рецептора интерлейкина 11 альфа (IL-11Ra); антигена стволовых клеток простаты (PSCA); протеиназы серина 21 (тестизина или PRSS21); рецептора сосудистого эндотелиального фактора роста 2 (VEGFR2); антигена Льюиса (Y); CD24; бета-рецептора фактора роста, полученного из тромбоцитов (PDGFR-бета); стадийно-специфического эмбрионального антигена-4 (SSEA-4); CD20; альфа-рецептора фолата (FRa или FR1); бета-рецептора фолата (FRb); рецепторной тирозин-протеинкиназы ERBB2 (Her2/neu); муцина 1, связанного с клеточной поверхностью (MUC1); рецептора эпидермального фактора роста (EGFR); молекулы адгезии нервных клеток (NCAM); простазы; простатической кислотой фосфатазы (PAP); мутированного фактора удлинения 2 (ELF2M); эфрина B2; белка активации фибробластов альфа (FAP); рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (рецептора IGF-I), карбоангидразы IX (CAIX); субъединицы протеасомы (просомы, макропаина), бета-тип а, 9 (LMP2); гликопротеина 100 (gp100); слитого белка-онкогена, состоящего из кластерной области точки разрыва (BCR) и гомолога 1 вирусного онкогена мышинной лейкозы Абельсона (Abl) (bcr-abl); тирозиназы; рецептора 2 эфрина типа A (EphA2); молекулы адгезии сиалил Льюиса (sLe); ганглиозида GM3 (aNeu5Ac (2-3) bDC1a1p (1-4) bDG1cp (1-1) Cer); трансглутаминазы 5 (TGS5); высокомолекулярного антигена, ассоциированного с меланомой (HMWMAA); о-ацетил-GD2 ганглиозида (OAcGD2); эндотелиального маркера 1 опухоли (TEM1/CD248); эндотелиального маркера 7 опухоли (TEM7R); клодина 6 (CLDN6); рецептора гормонов, стимулирующих щитовидную железу (TSHR); рецептора, связанного с G белком, класса C, группы 5, члена D (GPRC5D); открытая рамка считывания 61 хромосомы X (CXORF61); CD97; CD179a; киназы анапластической лимфомы (ALK); полисиаловой кислоты; специфичной для плаценты 1 (PLAC1); гексахаридной части globoH гликоцерамида (GloboH); антигена дифференцировки молочной железы (NY-BR-1); уроплакина 2 (UPK2); клеточного рецептора вируса гепатита А 1 (HAVCR1); адренорецептора бета 3 (ADRB3); паннексина 3 (PANX3); G-белок-связанного рецептора 20 (GPR20); комплекса антигена 6 лимфоцитов, локуса К 9 (LY6K); обонятельного рецептора 51E2 (OR51E2); белка альтернативной рамки считывания TCR гамма (TARP); белка опухоли Вильмса (WT1); антигена 1 рака/яичка (NY-ESO-1); антигена 2 рака/яичка (LAGE-1a); ассоциированного с меланомой антигена 1 (MAGE-A1); вариантного гена 6 ETS транслокации, расположенного на хромосоме 12p (ETV6-OML); белка спермы 17 (SPA17); члена 1A семейства X антигенов (XAGE1); ангиопоэтинсвязывающего рецептора 2 клеточной поверхности (Tie 2);

антигена-1 яичка рака меланомы (MAD-CT-1); антигена-2 яичка рака меланомы (MAD-CT-2); Fos-связанного антигена 1; опухолевого белка p53 (p53); мутанта p53; простерина; сурвивина; теломеразы; опухолевого антигена-1 рака карциномы простаты (PCT A-1 или Galectin 8), антигена 1 меланомы, распознаваемого Т-клетками (MelanA или MART1); мутанта крысиной саркомы (Ras); обратной транскриптазы теломеразы человека (hTERT); точек разрыва саркомы; ингибитора апоптоза меланомы (ML-IAP); ERG (ген слияния трансмембранной протеазы серина 2 (TMPRSS2), ETS); N-ацетилглюкозаминилтрансферазы V (NA17); белка с парными боксами Pax-3 (PAX3); андрогенного рецептора; циклина B1; гомолога, полученного из нейробластомы, вирусного онкогена v-мус птичьего миелоцитоматоза (MYCN); члена С семейства Ras гомологов (RhoC); родственного тирозиназе белка 2 (TRP-2); цитохрома P450 1B 1 (CYP1B 1); подобного CCCTC-связывающему фактору (белку с цинковыми пальцами) (BORIS или брат регулятора сайтов импринтинга), антигена 3 плоскоклеточной карциномы, распознаваемого Т-клетками (SART3); белка с парными боксами Pax-5 (PAX5); проакрозин-связывающего белка sp32 (OY-TE51); лимфоцит-специфической протеинтирозинкиназы (LCK); якорного белка 4 киназы А (AKAP-4); X точки разрыва 2 синовиальной саркомы (SSX2); рецептора конечных продуктов усиленного гликирования (RAGE-1); почечного повсеместного 1 (RU1); почечного повсеместного 2 (RU2); легумаина; вируса папилломы человека Е6 (HPV E6); вируса папилломы человека Е7 (HPV E7); кишечной карбоксилэстеразы; мутированного белка теплового шока 70-2 (mut hsp70-2); CD79a; CD79b; CD72; связанного с лейкоцитами иммуноглобулин-подобного рецептора 1 (LAIR1); Fc-фрагмента рецептора IgA (FCAR или CD89); члена 2 подгруппы А лейкоцитарного иммуноглобулиноподобного рецептора (LILRA2); член f семейства, подобного молекуле CD300 (CD300LF); член А семейства 12 доменов лектинов С-типа (CLEC12A); антигена 2 стромальных клеток костного мозга (BST2); белка 2 подобного EGF-подобный модуль-содержащему муцин-подобному рецептору гормонов (EMR2); лимфоцитарного антигена 75 (LY75); глипикана-3 (GPC3); Fc-рецепторо-подобного 5 (FCRL5); и иммуноглобулин лямбда-подобного полипептида 1 (IGLL1), MPL, биотина, с-МЫС эпителиального тэга, CD34, LAMP1 TROP2, GFRalpha4, CDH17, CDH6, NYBR1, CDH19, CD200R, SleA (CA19.9; антиген сиалила Льюиса); Фукозил-GM1, PTK7, gpNMB, CDH1-CD324, DLL3, CD276/B7H3, IL11Ra, IL13Ra2, CD179b-IGL11, TCRгамма-дельта, NKG2D, CD32 (FCGR2A), Tn антигена, Tim1-/HVFR1, CSF2RA (GMCSFR-альфа), TGFбетаP2, Люис антигена, цепи TCR-бета1, цепи TCR-бета2, цепи TCR-гамма, цепи TCR-дельта, FITC, рецептора леутенизирующего гормона (LHR), рецептора фолликулостимулирующего гормона (FSHR), рецептора гормона гонадотропина (CGHR или GR), CCR4, GD3, SLAMF6, SLAMF4, гликопротеина оболочки HIV1, HTLV1-Tax, CMV pp65, EBV-EBNA3c, KSHV K8.1, KSHV-gH, гемагглютинина вируса гриппа А (HA), GAD, PDL1, гуанилил циклазы С (GCC), аутоантитела к десмоглеину 3 (Dsg3), аутоантитела к десмоглеину 1 (Dsg1), HLA, HLA-A, HLA-A2, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, HLA-G, IgE, CD99, Ras G12V,

тканевого фактора 1 (TF1), AFP, GPRC5D, Клаудина18.2 (CLD18A2 или CLDN18A.2), Р-гликопротеина, STEAP1, LIV1, нектин-4, Кристо, gpA33, BST1/CD157, хлоридного канала с низкой проводимостью и антигена, распознаваемого антителом TNT.

[0057] Термин «антигенпрезентирующая клетка» или «АРС» относится к клетке иммунной системы, такой как вспомогательная клетка (*например*, В-клетка, дендритная клетка и тому подобное), которая презентует чужеродный антиген, образующий комплекс с основным комплексом гистосовместимости (МНС) на его поверхности. Т-клетки могут распознавать эти комплексы, используя их Т-клеточные рецепторы (TCR). АРС обрабатывают антигены и представляют их Т-клеткам.

[0058] Термин «противоинфекционный эффект» относится к биологическому эффекту, который может проявляться различными способами, включая, но не ограничиваясь, *например*, снижением титра инфекционного агента, уменьшением количества колоний инфекционного агента, уменьшением различных физиологических симптомов, связанных с инфекционным состоянием. «Противоинфекционный эффект» также может проявляться в способности пептидов, полинуклеотидов, клеток и антител в первую очередь предотвращать возникновение инфекции.

[0059] Термин «противоопухолевый эффект» или «противораковый эффект» относится к биологическому эффекту, который может проявляться различными способами, включая, но не ограничиваясь, *например*, уменьшение объема опухоли, уменьшение количества опухолевых клеток, уменьшение пролиферации опухолевых клеток или уменьшение выживаемости опухолевых клеток.

[0060] «Антигенсвязывающий домен» или «антигенсвязывающий модуль» или «антигенсвязывающий сегмент» или «антигенспецифический домен» (ASD) относится к полипептиду или пептиду, которые вследствие своей первичной, вторичной или третичной последовательности, посттрансляционных модификаций и/или заряда связываются с антигеном с высокой степенью специфичности. Антигенсвязывающий домен может быть получен из различных источников, например, антитела (полноразмерной тяжелой цепи, фрагмента Fab, одноцепочечных Fv (scFv) фрагментов, двухвалентных одноцепочечных антител или диател), неиммуноглобулинового связывающего белка, лиганда или рецептора. Однако существуют многочисленные альтернативы, такие как связанные цитокины (что приводит к распознаванию клеток, несущих рецептор цитокинов), аффитела, лиганд-связывающие домены из встречающихся в природе рецепторов, растворимый белок/пептидный лиганд для рецептора (*например*, на опухолевой клетке), пептиды и вакцины для стимуляции иммунного ответа, каждая из которых может быть использована в различных вариантах осуществления данного изобретения. В некоторых вариантах осуществления почти любая молекула, которая связывает данный антиген с высокой аффинностью, может быть использована в качестве ASD, как будет понятно специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит Т-клеточные рецепторы (TCR) или их части. В иллюстративных вариантах осуществления нуклеиновые кислоты,

кодирующие антигенсвязывающие домены, содержащие scFV, изложены в данном документе в SEQ ID NO: 642-902 и в **Таблице 6С**. В иллюстративных вариантах осуществления аминокислоты, кодирующие антигенсвязывающие домены, содержащие scFV, изложены в данном документе в SEQ ID NO: 4555-4815 в **Таблице 6С**.

[0061] Термин «константа ассоциации (Ka)» определяется как константа равновесия ассоциации рецептора и лиганда.

[0062] «Аутоантитело» относится к антителу, которое продуцируется В-клеткой, специфичному к аутоантигену.

[0063] Термин «аутоантиген» относится к эндогенному антигену, который стимулирует выработку аутоиммунного ответа, такого как продуцирование аутоантител. Аутоантиген также включает в себя аутоантиген или антиген из нормальной ткани, который является мишенью для опосредованного клеткой или опосредованного антителами иммунного ответа, который может привести к развитию аутоиммунного заболевания. Примеры аутоантигенов включают, но не ограничиваются ими, десмоглеин 1, десмоглеин 3 и их фрагменты.

[0064] «Авидность» относится к силе взаимодействия между связывающим агентом и его мишенью (*например*, к силе взаимодействия между антителом и его антигенной мишенью, рецептором и его родственной молекуле и тому подобным). Аффинность может быть слабой или сильной. Методы расчета аффинности антитела к антигену известны в данной области, включая использование экспериментов по связыванию для расчета аффинности. Активность антител в функциональных анализах (*например*, анализ проточной цитометрией) также отражает аффинность антител. Антитела и аффинности могут быть фенотипически охарактеризованы и сравнены с использованием функциональных анализов (*например*, анализ проточной цитометрией).

[0065] Используемый в данном документе термин «остов» относится к конкретной комбинации CAR (**Таблица 1**) и дополнительных модулей, как описано в **Таблице 2**. В иллюстративных вариантах осуществления конкретные комбинации CAR и вспомогательных модулей, которые содержат различные остовы, описаны в **Таблице 2**. В одном варианте осуществления CAR и вспомогательный модуль кодируются одной молекулой нуклеиновой кислоты. В другом варианте осуществления CAR кодируется первой молекулой нуклеиновой кислоты, а вспомогательный модуль кодируется второй молекулой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления вспомогательный модуль кодируется более чем одной молекулой нуклеиновой кислоты в зависимости от количества компонентов в дополнительных модулях.

[0066] Используемый в данном документе термин «полезные результаты» может включать, но никоим образом не ограничивается, уменьшением или облегчением тяжести болезненного состояния, предотвращением ухудшения болезненного состояния, лечением болезненного состояния, предотвращением развития болезненного состояния, снижением шансов пациента, развивающего заболевание и продлевающего жизнь или ожидаемую продолжительность жизни пациента. В качестве неограничивающих примеров «полезные

результаты» или «желаемые результаты» могут быть уменьшением одного или большего количества симптомов, уменьшением степени дефицита, стабилизированным (*т.е.* не ухудшающим) состоянием прогрессирования рака, задержкой или замедлением метастазирования или инвазивности, а также улучшением или смягчением симптомов, связанных с раком.

[0067] Используемый в данном документе термин «связывающий домен или молекула антитела» относится к белку, *например*, цепи иммуноглобулина или ее фрагменту, домену лиганда или его фрагменту (в зависимости от обстоятельств), включающему по меньшей мере один домен, *например*, последовательность переменного домена иммуноглобулина, которая может связываться с мишенью с аффинностью выше, чем неспецифический домен. Термин охватывает антитела и фрагменты антител или лиганды и фрагменты лигандов. В другом варианте осуществления молекула антитела представляет собой молекулу мультиспецифического антитела, *например*, она содержит множество последовательностей переменного домена иммуноглобулина, где первая последовательность переменного домена иммуноглобулина из множества обладает специфичностью связывания для первого эпитопа и второй последовательности переменного домена иммуноглобулина множественность имеет специфичность связывания для второго эпитопа. В другом варианте осуществления молекула мультиспецифического антитела представляет собой молекулу биспецифического антитела. Биспецифическое антитело обладает специфичностью к двум антигенам. Молекула биспецифического антитела характеризуется первой последовательностью переменного домена иммуноглобулина, которая обладает специфичностью связывания для первого эпитопа, и второй последовательностью переменного домена иммуноглобулина, которая обладает специфичностью связывания для второго эпитопа. **Биспецифическая** молекула может представлять собой биспецифическое антитело, связывающее Т клетки, в котором первый антигенсвязывающий домен связывается с антигеном (*например*, CD3ε), экспрессируемым на Т клетках, а второй антигенсвязывающий домен связывается с антигеном, экспрессируемым на вызывающей заболевание или ассоциированной с заболеванием клетке (*например*, раковая клетка). **Биспецифическая** антитела можно использовать для индукции опосредованной Т клетками цитотоксичности в отношении клеток, экспрессирующих антиген-мишень, распознаваемый их вторым антигенсвязывающим доменом. Антигенсвязывающие домены, описанные в данном раскрытии, могут быть применены для конструирования биспецифических связующих Т-клеток. Последовательности нуклеиновых кислот иллюстративных биспецифических связующих Т-клеток, содержащих антигенсвязывающие домены (*например*, scFv), описанные в данном раскрытии, представлены в SEQ ID NO: 3545-3830 (**Таблица 13**). Соответствующие аминокислотные последовательности представлены в SEQ ID NO: 7458-7721.

[0068] «Связывает тот же эпитоп, что и» означает способность антитела, scFv или

другого антигенсвязывающего домена связываться с антигеном-мишенью и иметь тот же эпитоп, что и иллюстративное антитело, scFv или другой антигенсвязывающий домен. В качестве примера, эпитопы приведенного в качестве примера антитела, scFv или другого связывающего агента и других антител могут быть определены с использованием стандартных методик картирования эпитопов. Методы картирования эпитопов, хорошо известные в данной области, включают протоколы картирования эпитопов в *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey. Например, линейные эпитопы могут быть определены, *например*, путем одновременного синтеза большого количества пептидов на твердых подложках, пептидов, соответствующих частям молекулы белка, и взаимодействия указанных пептидов с антителами, в то время как указанные пептиды все еще прикреплены к подложкам. Такие методы известны в данной области техники и описаны, *например*, в патенте США № 4708871; Geysen et al., (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. США* 8: 3998-4002; Geysen et al., (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. США* 82: 78-182; Geysen et al., (1986) *Mol. Immunol.* 23: 709-715. Эпитоп, связанный антигенсвязывающим доменом CAR, также может быть определен с помощью анализа эпитопного биннинга (Epitope Binning). Эпитопный биннинг представляет собой конкурентный иммуноанализ, используемый для характеристики, а затем сортировки библиотеки моноклональных антител против целевого белка. Антитела против сходной мишени тестируют против всех других антител в библиотеке попарно, чтобы увидеть, блокируют ли антитела связывание друг друга с эпитопом антигена. После того, как каждое антитело имеет профиль, созданный против всех других антител в библиотеке, конкурентный профиль блокирования создается для каждого антитела относительно других в библиотеке. Тесно связанные профили биннинга указывают на то, что антитела имеют одинаковый или близкородственный эпитоп и «связываются» вместе. Аналогично, конформационные эпитопы легко идентифицируются путем определения пространственной конформации аминокислот, *например*, путем обмена водород/дейтерий, рентгеновской кристаллографии и двумерного ядерного магнитного резонанса. См., *например*, *Epitope Mapping Protocols*, выше. Антигенные участки белков также могут быть идентифицированы с использованием стандартных графиков антигенности и гидропатии, таких как рассчитанные с использованием, *например*, программы Omega version 1.0, доступной от Oxford Molecular Group. Эта компьютерная программа использует метод Норр/Вудс, Норр et al., (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 78: 3824-3828; для определения профилей антигенности и техники Кайте-Дуолиттл, Кайте et al. (1982) *J.Mol. Biol.* 157: 105-132; для участков гидропатии. Чтобы определить, связываются ли выбранные моноклональные антитела против мишени (*например*, CD19) с уникальными эпитопами, каждое антитело может быть биотинилировано с использованием коммерчески доступных реагентов (Персе, Рокфорд, Иллинойс). Конкурентные исследования с использованием немеченых моноклональных антител и биотинилированных моноклональных антител могут быть выполнены с использованием планшетов ИФА, покрытых внеклеточным доменом CD19. Связывание биотинилированного mAb может быть обнаружено с

помощью стреп-авидин-щелочной фосфатазной пробы. Иллюстративные эпитопы человеческого антигена CD20, связанного с scFv и CAR согласно данному изобретению, представлены в SEQ ID NO: 15149-15154. Иллюстративные эпитопы ВСМА человека, связанные scFv и CAR данного изобретения, представлены в SEQ ID NO: 15155-15159. Иллюстративный эпитоп человеческого MPL-антигена, связанного scFv и CAR, по данному изобретению представлен в SEQ ID NO: 15160.

[0069] Используемый в данном документе термин «его биологический эквивалент» предназначен для того, чтобы быть синонимичным с «его эквивалентом», когда он относится к эталонному белку, антителу или его фрагменту, полипептиду или нуклеиновой кислоте и подразумевает те, которые имеют минимальную гомологию, при этом сохраняя желаемую структуру или функциональность. Если специально не указано в данном документе, предполагается, что любое из вышеперечисленного также включает его эквиваленты. Например, эквивалент подразумевает по меньшей мере, около 70% гомологии или идентичности, или по меньшей мере, 80% гомологии или идентичности и, альтернативно, или по меньшей мере, около 85%, или, альтернативно по меньшей мере, около 90%, или, альтернативно по меньшей мере, около 95%, или альтернативно по меньшей мере, 98% гомологии или идентичности и проявляют, по существу, биологическую активность, эквивалентную эталонному белку, полипептиду, антителу или его фрагменту или нуклеиновой кислоте. Альтернативно, когда ссылаются на полинуклеотиды, их эквивалентом является полинуклеотид, который гибридизуется в строгих условиях с эталонным полинуклеотидом или его комплементом. Альтернативно, когда ссылаются на полипептиды или белки, их эквивалент представляет собой экспрессированный полипептид или белок из полинуклеотида, который гибридизуется в строгих условиях с полинуклеотидом или его комплементом, который кодирует эталонный полипептид или белок.

[0070] Используемый в данном документе термин «CDR» или «область, определяющая комплементарность» предназначен для обозначения несмежных сайтов связывания антигенов, обнаруженных в вариабельной области полипептидов как тяжелой, так и легкой цепи. Эти конкретные области были описаны Kabat et al., *J. Bioi. Chem.* 252: 6609-6616 (1977); Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest" (1991); Chothia et al., *J. Mol. Bioi.* 196: 901-917 (1987); и MacCOLLum et al., *J. Mol. Bioi.* 25 262: 732-745 (1996), где определения включают перекрывающиеся или подгруппы аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Тем не менее, подразумевается, что применение любого определения для обозначения CDR антитела или привитых антител или их вариантов находится в пределах объема термина, определенного и используемого в данном документе. Как в данном документе используется, различные CDR антитела также могут быть определены комбинацией различных определений. Например, vHCDR1 может быть определен на основе нумерации Кабата, а VHCDR2 может быть определен на основе нумерации Чотиа. Аминокислотные остатки, которые охватывают CDR, как определено в каждой из

приведенных выше ссылок, являются следующими:

ОПРЕДЕЛЕНИЯ CDR

	Кабат	Чотия	МакКаллум
VHCDR1	31-35	26-32	30-35
VHCDR2	50-65	53-55	47-58
VHCDR3	95-102	96-10	193-101
VLCDR1	24-34	26-32	30-36
VLCDR2	50-56	50-52	46-55
VLCDR3	89-97	91-96	89-96

(Номера остатков соответствуют указанным ссылкам).

[0071] SEQ ID CDR различных сегментов vL и vH, которые могут образовывать антигенсвязывающие домены CAR по данному изобретению, представлены в SEQ ID NO: 13204-14121 и SEQ ID NO: 14122-15039 соответственно (**Таблицы 6А, В**) и в Таблицах 5-6 в РСТ/US2017/064379, которые включены в данное описание в качестве ссылки.

[0072] В некоторых вариантах осуществления ссылка на антигенсвязывающий модуль (такой как Fab-подобный или Fv-подобный антигенсвязывающий модуль), который специфически связывается с антигеном-мишенью, означает, что антигенсвязывающий модуль связывается с антигеном-мишенью (а) с аффинностью, которая по меньшей мере, примерно в 10 раз (*например*, примерно в 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000 или более) превышает его аффинность связывания с другими молекулами; или (б) с K_d не более чем примерно 1/10 (*например*, 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50, 1/75, 1/100, 1/200, 1/300 В 1/400, 1/500, 1/750, 1/1000 или менее) раз по сравнению с K_d для связывания с другими молекулами. Аффинность связывания может быть определена способами, известными в данной области, такими как ИФА, анализ проточной цитометрии (FACS) или анализ радиоиммунопреципитации (RIA). K_d можно определить способами, известными в данной области, такими как анализ поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием, например, инструментов Biacore, или анализ кинетического исключения (KinExA) с использованием, например, инструментов Sapidyne.

[0073] «Рак» и «раковый» относятся или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Примеры рака включают, но не ограничиваются ими, В-клеточные лимфомы (лимфомы Ходжкина и/или неходжкинские лимфомы), Т-клеточные лимфомы, миелому, миелодиспластический синдром, рак кожи, опухоль головного мозга, рак молочной железы, рак прямой кишки, рак прямой кишки, рак пищевода, рак анального канала, рак неизвестного первичного участка, эндокринный рак, рак яичка, рак легкого, гепатоцеллюлярный рак, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак шейки матки, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, рак мочевыводящих путей, рак репродуктивных органов, рак почки, карциному, меланому, рак головы и шеи, рак головного мозга (*например*, мультиформную глиобластому), рак простаты, включая

андроген-зависимый рак простаты и андроген-независимый рак простаты и лейкоз. Другие раковые и клеточные пролиферативные нарушения будут легко узнаваться в данной области. Термины «опухоль» и «рак» используется в данном документе взаимозаменяемо, *например*, оба термина включают твердые и не твердые, *например*, диффузные или циркулирующие, опухоли. Используемый в данном документе термин «рак» или «опухоль» включает предраковые, а также злокачественные опухоли и опухоли. Термин «рак» подразумевает включение всех типов злокачественных новообразований или онкогенных процессов, метастатических тканей или злокачественно трансформированных клеток, тканей или органов, независимо от гистопатологического типа или стадии инвазивности. Иллюстративные твердые опухоли включают злокачественные новообразования, *например* аденокарциномы, саркомы и карциномы, различных систем органов, таких как поражения молочной железы, печени, легких, головного мозга, лимфоидные поражения, желудочно-кишечного тракта (*например*, толстой кишки), мочеполового тракта (*например*, почечные, уротелиальные) клетки), простаты и глотки. Аденокарциномы включают раковые заболевания, такие как большинство случаев рака толстой кишки, рак прямой кишки, почечно-клеточного рака, рака печени, немелкоклеточного рака легкого, рака тонкой кишки и рака пищевода. В одном варианте осуществления рак представляет собой меланому, *например* меланому на поздней стадии. Метастатические поражения вышеупомянутых раковых заболеваний также можно лечить или предотвращать с использованием способов и композиций по данному изобретению. Примеры других видов рака, которые можно лечить или предотвращать, включают рак поджелудочной железы, рак кости, рак кожи, кожную или внутриглазную злокачественную меланому, рак матки, рак яичников, рак прямой кишки, рак головы или шеи, рак анальной области, рак желудка, рак яичка, рак матки, рак маточных труб, рак эндометрия, рак шейки матки, рак влагалища, рак вульвы, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, рак пищевода, рак тонкого кишечника, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак парашитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягких тканей, рак мочеиспускательного канала, рак полового члена, хронические или острые лейкозы, включая острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, твердые опухоли детского возраста, лимфоцитарную лимфому, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, карциному почечной лоханки, новообразование центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, ангиогенез опухоли, опухоль оси позвоночника, глиому ствола мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфома, рак, вызванный окружающей средой включая индуцированный асбестом, и комбинации указанных видов рака. Лечение метастатического рака, *например* метастатического рака, который экспрессирует PD-L1 (Iwai et al. (2005) Int. Immunol. 17: 133-144) может быть осуществлено с использованием молекул антител, описанных в данном документе. Иллюстративные раковые заболевания, рост которых можно ингибировать, включают

раковые заболевания, обычно реагирующие на иммунотерапию. Кроме того, рецидивирующие или резистентные злокачественные новообразования можно лечить с использованием молекул, описанных в данном документе.

[0074] «Химиотерапевтические агенты» представляют собой соединения, которые, как известно, используются в химиотерапии при раке. Неограничивающие примеры химиотерапевтических агентов могут включать алкилирующие агенты, такие как тиотепа и СУТОХАН[®] циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилломеламин; ацетогенины (особенно булатацин и булатацинон); камптотецин (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; СС-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); криптофицины (особенно криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и СВ1-ТМ1); элейтеробин; панкреатистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотные горчицы, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, гидрохлорид окиси мехлорэтамину, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловая горчица; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимнустин; антибиотики, такие как энедииновые антибиотики (*например*, калихеамицин, особенно калихеамицин гамма-1 и калихеамицин-омега-1 (см., *например*, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); динемидин, включая динемидинат А, бисфосфон, такие как клодронат, эсперамицин, а также хромофор неокарзиностатина и родственные хромопротеины энедииновые антибиотические хромофоры), аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, каминомицин, карзинофилин, хромомицин, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, ADRIAMYCIN[®] доксорубицин (включая морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эсорубицин, идарубицин, марцеломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофенольная кислота, ногаламцин, nogalamycin оливомицины, пепломицин, потфирамицин, пурамицин, келамицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолонпропионат, эпителиостанол, мепитиостан, тестолактон; антиадреналовые средства, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; наполнитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамидный гликозид; аминолевулиновая кислота; энилурацил;

амсакрин; бестрабуцил; бизантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; эльформитин; ацетат эллиптиния; эпотилон; этоглюцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лониданин; мейтансиноиды, такие как мейтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраэрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK[®] полисахаридный комплекс (JHS Natural Products, Юджин, орегон); разоксан; ризоксин; сизофуран; спирогерманий; тенуазоновая кислота; триазиквон; 2,2', 2'' - трихлортриэтиламин; трихотецены (особенно токсин Т-2, верракурин А, риридин А и ангидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ара-С»); циклофосфамид; тиотеп; таксоиды, *например*, TAXOL[®] паклитаксел (Bristol-Myers Squibb Oncology, Принстон, Нью-Джерси), ABRAXANE[®], не содержащая кремофоров, созданная альбумином композиция наночастиц паклитаксела (American Pharmaceutical Partners, Шаумберг, Иллинойс), и TAXOTERE[®] доксетаксел (Rhone-Poulenc Rorer, Антони, Франция); хлоранбуцил; GEMZAR[®] гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как *цис*- платин, оксалиплатин и карбоплатин; винбластин; платины; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; навелбин; винорелбин; новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; иринотекан (камтостар, СРТ-11) (включая схему лечения иринотеканом с 5-FU и лейковорином); ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (ДМФО); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин; комбретастантин; лейковорин (LV); оксалиплатин, включая схему лечения оксалиплатином (FOLFOX); лапатиниб (тикерб); ингибиторы РКС-альфа, Raf, H-Ras, EGFR (*например*, эрлотиниб (Tarceva[®])) и VEGF-A, которые уменьшают пролиферацию клеток, и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленного или их комбинации.

[0075] «Химерные антигенные рецепторы» (CAR) представляют собой рецепторы искусственных (не встречающихся в природе) иммунных клеток (*например*, Т-клеток), которые предполагается использовать в качестве терапии рака с использованием технологии, называемой адаптивным переносом клеток. CAR также известны как искусственные Т-клеточные рецепторы, химерные Т-клеточные рецепторы или химерные иммунорецепторы. Антигенсвязывающие, сигнальные и стимулирующие функции комплекса манипулировали методами генетической рекомбинации с одной полипептидной цепью, обычно называемой химерным антигенным рецептором (CAR). См., *например*, Eshhar, патент США № 7741465; Eshhar, публикация заявки на патент США № 2012/0093842. CAR конструируются специально для стимуляции активации и пролиферации Т-клеток в ответ на специфический антиген, с которым связывается CAR. Как правило, CAR относится к набору полипептидов, обычно двух в простейших вариантах осуществления, которые при экспрессии в иммунной эффекторной клетке придают клетке специфичность в отношении клетки-мишени, обычно раковой клетки, и генерируют внутриклеточный сигнал. В некоторых вариантах осуществления CAR

содержит по меньшей мере, внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и цитоплазматический сигнальный домен (также называемый в данном документе «внутриклеточным сигнальным доменом»), содержащий функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы и/или костимулирующей молекулы. В некоторых аспектах набор полипептидов является смежным друг с другом. В одном аспекте стимулирующая молекула представляет собой зета-цепь, связанную с рецепторным комплексом Т-клеток. В одном аспекте цитоплазматический сигнальный домен дополнительно содержит один или большее количество функциональных сигнальных доменов, полученных по меньшей мере из одной костимулирующей молекулы, как определено ниже. В одном варианте осуществления костимулирующая молекула выбрана из костимуляторных молекул, описанных в данном документе, *например* 4-1BB (*т. е.* CD137), CD27 и/или CD28. В одном варианте осуществления CAR содержит необязательную лидерную последовательность на amino-конце (N-ter) слитого белка CAR. В одном варианте осуществления CAR дополнительно содержит лидерную последовательность на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена, где лидерная последовательность необязательно отщепляется от антигенсвязывающего домена (*например*, scFv) во время клеточного процессинга и локализации CAR в клеточной мембране. В различных вариантах осуществления CAR представляют собой рекомбинантные полипептиды, содержащие антигенспецифический домен (ASD), шарнирный участок (HR), трансмембранный домен (TMD), необязательный костимуляторный домен (CSD) и внутриклеточный сигнальный домен (ISD). Необязательный костимуляторный домен обычно отсутствует в конструкциях CAR 1-го поколения. Антиген-мишень, название антигенсвязывающего домена и последовательности нуклеиновых кислот нескольких иллюстративных CAR 1-го поколения, содержащих различные антигенсвязывающие домены (*например*, фрагменты vL и vH, vHH, лиганды и рецепторы *и т. д.*), описанные в данном раскрытии, и коэкспрессирующие вспомогательные модули кодирования NEMO-K277A и PAC представлено в SEQ ID NO: 1594-1899 (**Таблица 12**). Эти конструкции CAR несут сигнальный пептид CD8 человека, шарнирную и трансмембранную область CD8 и внутриклеточный сигнальный домен CD3 ζ человека. Эти конструкции также несут линкер MYC между антигенсвязывающим доменом и шарнирной областью CD8, что является необязательным. Последовательности нуклеиновых кислот нескольких иллюстративных CAR 1-го поколения, содержащих различные антигенсвязывающие домены (*например*, фрагменты vL и vH, vHH, лиганды и рецепторы *и т. д.*), описанные в данном раскрытии и коэкспрессирующие дополнительные модули, кодирующие vFLIP K13 и PAC, представлены в SEQ ID NO: 1016-1317 (**Таблица 13**). Последовательности нуклеиновых кислот нескольких иллюстративных CAR 2-го поколения, содержащих различные антигенсвязывающие домены (*например*, фрагменты vL и vH, vHH, лиганды и рецепторы *и т. д.*), описанные в данном раскрытии и включающие костимуляторный домен 41BB, представлены в SEQ ID NO: 1318 -1593 (**Таблица 13**). Эти конструкции CAR также несут

линкер МУС между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом и вспомогательный модуль, кодирующий ген устойчивости к пурамицину (РАС), который отделен от кассеты CAR последовательностью Furine-SGSG-T2A. Вспомогательный модуль, кодирующий vFLIP-K13, NEMO-K277A и РАС не являются обязательными в описанном выше 1-го и CAR 2-го поколения. Таким образом, CAR с антигенсвязывающими доменами (*т.е.* фрагменты vL и vH, vHH, лиганды и рецепторы *и т.д.*), описанные в данном раскрытии, могут быть сконструированы без vFLIP-K13, NEMO-K277A и/или РАС. Как таковые, эти вспомогательные модули вместе с вышерасположенными линкерными последовательностями разрезания (*например*, F2A, P2A или T2A) могут быть удалены из CAR, представленных SEQ ID NO: 1016-1899. Альтернативно, вспомогательный модуль, кодирующий vFLIP-K13, NEMO-K277A и/или РАС, может быть заменен вспомогательными модулями, кодирующими другие белки, такие как hNEMO-K277A-deltaV249-K555, mNEMO-K270A, K13-opt, IKK2-S177E-S181E или IKK1-S176E-S180E и MyD88-L265P, FKBPx2-NEMO, NEMO-L600-FKBPx2, TCL-1A, MTCP-1 и CMV-141 *и т. д.* Используемый в данном документе термин «CAR» также включает в себя более новые подходы к приданию антигенной специфичности клеткам, таким как химерные молекулы антитело-TCR или Ab-TCR или Ab-TCR (WO 2017/070608 A1, включенная в данное описание посредством ссылки), слитые белки рецептора TCR или TFP (WO 2016/187349 A1, включенный в данный документ в качестве ссылки), Синтетические иммунные рецепторы (SIR) (см. WO 2018/102795 A1, включенный в данный документ в качестве ссылки), трифункциональный спариватель Т-клеточного антигена (Tri-TAC) (см., WO 2015/117229 A1, включены в данное описание в качестве ссылки). Последовательности нуклеиновых кислот нескольких иллюстративных TFP, включающих различные антигенсвязывающие домены (*например*, фрагменты vL и vH, vHH, лиганды и рецепторы *и т.д.*), описанные в данном раскрытии и основанные на цепях CD3ε, CD3δ, CD3γ и CD3ζ и коэкспрессирующие опциональный вспомогательный модуль NEMO-K277A, представлены в SEQ ID NO: 1900-2205, 2206-2511, 2512-2817, 2818-3123 соответственно (**Таблица 13**). Порядок антигенсвязывающих доменов, содержащихся в конструкции различных архитектур CAR и BiTE, перечисленных в **Таблице 13**, такой же, как порядок конструкций на архитектуре zCAR-K277A, представленных в **Таблице 12**. Таким образом, SEQ ID NO аминокислоты и нуклеиновой кислоты для CAR, принадлежащего данной архитектуре (*например*, zCAR-K13) и содержащего специфический антигенсвязывающий домен, могут быть определены путем изучения **Таблиц 12** и **Таблицы 13**. Таким образом, в **Таблице 12** продемонстрировано, что CAR на архитектуре zCAR-NEMO-K277A и содержащий антигенсвязывающий домен huFMC63-11- (vL-vH) является 2-^й конструкцией в **Таблице 12** и представлен нуклеиновой кислотой и аминокислотой SEQ ID NO: 1595 и 5508 соответственно. SEQ ID NO нуклеиновой кислоты и аминокислоты соответствующего CAR на архитектуре zCAR-K13 можно определить, изучив **Таблицу 13**, которая демонстрирует, что 2-^я конструкция на этой архитектуре имеет SEQ ID NO нуклеиновой кислоты и аминокислоты: 1017 и 4930

соответственно. Аналогичный подход можно использовать для определения SEQ ID NO: нуклеиновых кислот и аминокислот других конструкций CAR, принадлежащих к разным архитектурам и BiTE. В Таблице 10 приведены SEQ ID NO нуклеиновой кислоты и аминокислоты нескольких иллюстративных CAR, принадлежащих к разным основным цепям и нацеленных на гликопротеин оболочки HIV-1 на основе антигенсвязывающих доменов v1 и vH HIV1-N49P6. В Таблице 11 представлены SEQ ID NO нуклеиновых кислот и аминокислот нескольких иллюстративных CAR, принадлежащих к основным цепям, продемонстрированным в Таблице 10, но содержащих различные антигенсвязывающие домены. Таким образом, нуклеиновая кислота и аминокислота SEQ ID NO CAR на конкретном острове, содержащем антигенсвязывающий домен, продемонстрированный в Таблице 11, могут быть определены путем первого определения его рангового порядка в Таблице 10. Таким образом, 1-е поколения CAR, содержащее основу vFLIP-K13 является третьим CAR в списке в Таблице 10, SEQ ID NO нуклеиновой кислоты 1 -го поколения CAR коэкспрессирующего vFLIP-K13 и содержащего HIV1-N49P7 антигенсвязывающий домен может быть легко определен из Таблицы 11, как имеющий SEQ ID NO: 8740 (т.е. 3-я конструкция в серии, начинающейся с 8738). Используя аналогичный подход, определяют, что аминокислота SEQ ID NO этой конструкции CAR является SEQ ID NO: 11438. Поскольку CAR имеют модульную конструкцию, последовательность нуклеиновой кислоты и аминокислоты CAR/BiTE, содержащего различные антигенсвязывающие домены или вспомогательные модули, может быть легко определена специалистом в данной области техники с использованием последовательности различных модулей и приведена в качестве примера CAR и BiTE конструкций раскрытых в данном раскрытии. Обычно используются «клетки CAR-T», которые относятся к T клеткам, которые были сконструированы для экспрессии химерного рецептора антигена. Таким образом, T-лимфоциты, несущие такие CAR, обычно называют CAR-T-лимфоцитами. CAR могут также экспрессироваться в клетках, отличных от T-клеток, таких как гемопоэтические стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC), NK-клетки и макрофаги.

[0076] «Оптимизация кодонов» или «контроль за видовым предпочтением кодонов» относится к предпочтительному использованию кодонов конкретной клеткой-хозяином. Как будет понятно специалистам в данной области техники, может быть выгодно модифицировать кодирующую последовательность для усиления ее экспрессии в конкретном хозяине. Генетический код избыточен с 64 возможными кодонами, но большинство организмов обычно используют подгруппу этих кодонов. Кодоны, которые чаще всего используются у вида, называются оптимальными кодонами, а те, которые не используются очень часто, классифицируются как редкие или малоиспользуемые кодоны.

[0077] Оптимизированные кодирующие последовательности, содержащие кодоны, предпочтительные для конкретного прокариотического или эукариотического хозяина (см. также Murray et al. (1989) Nucl. Acids Res. 17: 477-508) могут быть получены, например, для увеличения скорости трансляции или для получения рекомбинантных

транскриптов РНК, имеющих желательные свойства, такие как более длительный период полужизни, по сравнению с транскриптами, полученными из неоптимизированной последовательности. Стоп-кодона трансляции также могут быть изменены, чтобы отразить предпочтения хозяина. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что из-за вырожденной природы генетического кода различные ДНК-соединения, различающиеся по своим нуклеотидным последовательностям, могут быть применены для кодирования данного полипептида по данному изобретению.

[0078] Используемый в данном документе термин «коэкспрессировать» относится к экспрессии двух или более полинуклеотидов или генов. Гены могут представлять собой нуклеиновые кислоты, кодирующие, например, один белок или химерный белок в виде одной полипептидной цепи. CAR или TCR, описанные в данном документе, могут кодироваться одной полинуклеотидной цепью и экспрессироваться в виде одной полипептидной цепи, которая впоследствии расщепляется на разные полипептиды, каждый из которых представляет отдельную функциональную единицу. В некоторых вариантах осуществления, когда CAR или TCR состоит из двух или более функциональных полипептидных единиц, различные функциональные единицы совместно экспрессируются с использованием одной или нескольких полинуклеотидных цепей. В одном варианте осуществления костимуляция обеспечивается вспомогательным модулем, который коэкспрессируется с CAR или TCR, но не является неотъемлемой частью полипептида CAR или TCR. Такой вспомогательный модуль, который обеспечивает костимуляцию для CAR- или TCR-экспрессирующей клетки или любой клетки, но не является неотъемлемой частью CAR или полипептида TCR, называется CAR-независимым костимуляторным модулем или CICM (CAR independent costimulatory module). В другом варианте осуществления различные полинуклеотидные цепи связаны последовательностями нуклеиновых кислот, которые кодируют разрезаемые линкеры (*например*, T2A, F2A, P2A, E2A и т. д.) (**Таблица 6D**). В другом варианте осуществления мотив Ser-Gly-Ser-Gly (SGSG) (SEQ ID NO: 4844) также добавляется перед последовательностями разрезаемого линкера для повышения эффективности разрезания. Полинуклеотиды, кодирующие различные единицы CAR или TCR, могут быть связаны последовательностями IRES (внутренний сайт входа в рибосому - Internal Ribosomal Entry Site). Альтернативно, разные функциональные единицы CAR или TCR кодируются двумя разными полинуклеотидами, которые не связаны через линкер, а вместо этого кодируются, например, двумя разными векторами. Последовательности нуклеиновых кислот и аминокислот иллюстративных расщепляемых линкеров и сайтов разрезания фурином представлены в **Таблице 6D**.

[0079] «Консервативная замена» или «консервативные модификации последовательности» относится к аминокислотным модификациям, которые не оказывают существенное влияние или не изменяют характеристик связывания или функции кодируемого белка. Например, «модификации консервативных последовательностей» относится к модификациям аминокислот, которые не оказывают существенного влияния

или не изменяют характеристики связывания или функцию конструктора CAR по данному изобретению (*например*, консервативное изменение в константной цепи в антителе, фрагменте антитела или не-иммуноглобулиновых связывающих доменах). Такие консервативные модификации включают аминокислотные замены, добавления и делеции. Модификации могут быть введены стандартными методами, известными в данной области, такими как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативные аминокислотные замены представляют собой замены, в которых аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, были определены в данной области. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (*например*, лизин, аргинин, гистидин), кислотные боковые цепи (*например*, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (*например*, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярные боковые цепи (*например*, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленные боковые цепи (*например*, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (*например*, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, один или большее количество аминокислотных остатков в CAR по данному изобретению могут быть заменены другими аминокислотными остатками из того же семейства боковых цепей, и измененный CAR может быть протестирован с использованием анализов связывания и/или функциональности, описанных в данном документе.

[0080] Термин «константная область альфа-рецептора Т-клеток» или «константная цепь альфа-рецептора Т-клеток» или «TCR α » или «C α » определяется как белок, представленный как SEQ ID NO: 15041, или эквивалентные остатки (*т.е.* гомолог) от вида отличного от человека, *например* мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и тому подобного. Данное раскрытие также обеспечивает определенные мутации полипептидов TCR α , которые можно использовать при конструировании SIR и Ab-TCR (**Таблицы 3 и 6D**). Например, сайты мутации в C α , которые демонстрируют повышенную экспрессию и уменьшенное неправильное связывание, расположены в положениях 91, 92, 93 и 94 SEQ ID NO 15041. Полипептид TCR с мутацией Thr 48 Cys (T48C) в C α и мутацией Ser-57-Cys (S57C) в цепи C β 1 или C β 2 (более подробно описанный в другом месте в данном документе) приводит к дополнительной дисульфидной связи между двумя константными цепями TCR (α и β). Это, в свою очередь, приводит к уменьшению неправильного связывания с эндогенными цепями TCR в иммунной клетке и улучшенной функциональности. Подобным образом, CAR с мутацией Ser 61 Arg (S61R) в C α (SEQ ID NO: 15048) и мутация Arg 79 Gly (R79G) в цепи C β 1 или C β 2 (более подробно описанная в другом месте в данном документе) приводит к уменьшению неправильного связывания с эндогенной цепью TCR и размноженные функциональные возможности благодаря дизайну «выступ в отверстие» для сопряжения. Данное изобретение относится к полипептидам C α , имеющим одну, несколько или все мутации в соответствии с

приведенной ниже **Таблицей 3**, которые можно использовать при конструировании SIR и Ab-TCR.

Таблица 3: Мутации согласно данному раскрытию в человеческой константной области TCR-альфа (Cα)			
Положение (SEQ ID NO: 15041)	Аминокислота в диком типе	Мутация	ТИП
10	Y	C	дисульфидная связь
15	S	C	дисульфидная связь
45	T	C	дисульфидная связь
48	T	C	дисульфидная связь
61	S	P	Выступ в отверстие
91	P	S	Муринизация
92	E	D	Муринизация
93	S	V	Муринизация
94	S	P	Муринизация

[0081] Геном человека кодирует две высокогомологичные константные бета-цепи TCR; TCR beta1 (TCR β 1 или TCRb1 или c β 1) и TCR beta2 (TCR β 2 или TCRb2 или c β 2). CAR в раскрытии могут содержать любую из этих двух цепей. Аналогично, в способах по данному изобретению можно использовать цепи TCR beta1 или TCR beta2 других видов млекопитающих.

[0082] Термин «константная цепь Т-клеточного рецептора-бета 1» или «константная область Т-клеточного рецептора-бета 1» (TCR-бета1 или TCR β 1 или TCRb1 или hTCR-бета1 или C β 1) определяется как белок, представленный как SEQ ID NO : 15051 или эквивалентные остатки (*m.e.* гомолог) из вида отличного от человека, *например*, мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и тому подобного.

[0083] Термин «константная цепь Т-клеточного рецептора-бета 2» или «константная область Т-клеточного рецептора-бета 2» (TCR-бета2 или TCR β 2 или TCRb2 или C β 2) определяется как белок, представленный как SEQ ID NO: 15052 или эквивалентные остатки (*m. e.* гомолог) из вида отличного от человека, *например* мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и тому подобного.

[0084] Термин «константная цепь бета-рецептора Т-клеток» или «константная область бета-рецепторов Т-клеток» (TCR-бета или TCR β или TCRb или C β) определяется как белок, представленный как SEQ ID NO: 15051-15053 или эквивалентные остатки (*m. e.* гомолог) из вида отличного от человека, *например*, мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и тому подобного.

[0085] Белковые последовательности как для C β 2 (SEQ ID NO: 15052), так и для C β 1 (SEQ ID NO: 15051) известны (**Таблица 6D**). Различия между последовательностями C β 2 и β 1 легко идентифицировать выравниванием последовательностей, используя

типичные и обычные навыки в данной области. Данное раскрытие также обеспечивает определенные мутации TCR β , которые можно использовать при конструировании SIR и Ab-TCR. Например, в данном документе представлены сайты мутации в C β , которые демонстрируют повышенную экспрессию и пониженное нарушение спаривания с эндогенными цепями TCR α . Эти сайты мутаций в C β 1 и C β 2 расположены в положениях 18, 22, 57, 79, 133, 136 и 139 SEQ ID NO: 15051 и 15052 и суммированы в **Таблицах 4 и 5** ниже. Сайты мутаций в C β 1 и C β 2 идентичны по своим позициям. Единственная разница между двумя последовательностями заключается в том, что присутствует мутация в положении 136. В этом положении глутаминовая кислота (E) присутствует в C β 2, тогда как валин присутствует в C β 1.

Таблица 4: Мутации согласно данному раскрытию в константной области TCR-бета1 (C β 1) человека

Положение (SEQ ID NO: 15051)	Аминокислота в диком типе	Мутация	ТИП
15	E	C	дисульфидная связь
17	S	C	дисульфидная связь
18	E	K или R	Муринизация
22	S	A	Муринизация
57	S	C	дисульфидная связь
59	D	C	дисульфидная связь
77	S	C	дисульфидная связь
79	R	G	Выступ в отверстие
133	F	I	Муринизация
136	V	A	Муринизация
139	Q	H	Муринизация

Таблица 5: Мутации согласно данному раскрытию в константной области TCR-бета2 (C β 2) человека

Положение (SEQ ID NO: 15052)	Аминокислота в диком типе	Мутация	ТИП
15	E	C	дисульфидная связь
17	S	C	дисульфидная связь
18	E	K или R	Муринизация
22	S	A	Муринизация
57	S	C	дисульфидная связь
59	D	C	дисульфидная связь

77	S	C	дисульфидная связь
79	R	G	Выступ в отверстие
133	F	I	Муринизация
136	E	A	Муринизация
139	Q	H	Муринизация

[0086] Термин «константная цепь TCR-гамма» или «константная область TCR-гамма» (TCR-гамма или TCR γ или TCRg или TCR-gamma1 или TCR γ 1 или TCRg1 или C γ) определяется как белок, представленный как SEQ ID NO: 15068 или эквивалентные остатки (*m.e.* гомолог) из вида отличного от человека, *например* мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и тому подобного.

[0087] Термин «константная цепь TCR-дельта» или «константная область TCR-дельта» (TCR-дельта или TCR δ или TCRd или C δ) определяется как белки, представленные в виде SEQ ID NO: 15069 или эквивалентных остатков (*m.e.* гомолог) из вида отличного от человека, *например* мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и тому подобного.

[0088] Будет признано, что белки могут иметь идентичность или гомологию друг с другом и сохранять сходные или идентичные функции. Данное раскрытие включает константные области TCR, которые имеют 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 98,5%, 99% или 99,9% идентичности с любой из последовательностей, описанных в данном документе, при сохранении биологической активности.

[0089] Соответственно, данное изобретение относится к константной цепи рецептора T клетки, имеющей последовательность, выбранную из группы, состоящей из: (a) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 98% идентична последовательности SEQ ID NO: 15041 и которая может иметь одну или большее количество мутаций в положениях 61, 91, 92, 93 и/или 94; (b) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 15051 и может иметь одну или большее количество мутаций в положениях 18, 22, 57, 79, 133, 136 и/или 139; (c) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 15052 и может иметь одну или большее количество мутаций в положениях 18, 22, 57, 79, 133, 136 и/или 139; (d) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 98% идентична последовательности SEQ ID NO: 15068; и (e) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 98% идентична последовательности SEQ ID NO: 15069. Константные цепи рецептора T-клеток любого из (a) - (e) сохраняют по меньшей мере одну биологическую активность константной цепи рецептора T-клеток дикого типа, с которой они имеют идентичность или гомологию.

[0090] Термин «конститутивно активный» относится к молекуле, *например*, белку, который обладает сигнальной активностью без необходимости стимуляции. Примерами конститутивных активных белков являются NEMO-K277A и vFLIP K13, поскольку они могут активировать передачу сигналов NF- κ B при экспрессии в подходящей клетке без

необходимости дополнительной стимуляции.

[0091] Термин «костимуляторная молекула» или «костимуляторный рецептор» относится к родственному связывающему партнеру на Т клетке, который специфически связывается с костимулирующим лигандом, тем самым опосредуя костимуляторный ответ Т клетки, такой как, но не ограничиваясь этим, пролиферация. Костимуляторные внеклеточные молекулы представляют собой молекулы клеточной поверхности, отличные от рецепторов антигена или их лигандов, которые способствуют эффективному иммунному ответу. Костимуляторные молекулы включают, но не ограничиваются ими, молекулу МНС класса I, BTLA и рецептор лиганда Toll, а также OX40, Dap10, CD27, CD28, CD2, CD5, CD8, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), Lck, TNFR-I, TNFR-II, Fas, CD30, CD40 и 4-1BB (CD137). Дополнительные примеры таких костимуляторных молекул включают CD8, ICAM-1, GITR, BAFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, CD4, CD8альфа, CD8beta, IL2R бета, IL2Rгамма, 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, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IP0-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS SLP-76, PAG/Cbp, CD19a и лиганд, который специфически связывается с CD83. Костимулирующий рецептор может экспрессироваться на клетках других Т-клеток, таких как НК-клетки или макрофаги.

[0092] «Костимуляторный внутриклеточный сигнальный домен» или «Костимуляторный домен» (CSD) может быть внутриклеточной частью костимуляторного рецептора. Костимуляторная молекула может быть представлена в следующих семействах белков: белки рецептора TNF, иммуноглобулиноподобные белки, рецепторы цитокинов, интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM) и активирующие рецепторы NK-клеток. Примеры таких молекул включают CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFR, HVEM, ICAM-1, антиген-1, связанный с функцией лимфоцитов (LFA-1), CD2, CD8, CD7, CD287, LIGHT, NKG2C, NKG2D, SLAMF7, NKp80, NKp30, NKp44, NKp46, CD160, B7-H3 и лиганд, который специфически связывается с CD83 и тому подобное. Внутриклеточный сигнальный домен может содержать всю внутриклеточную часть или весь нативный внутриклеточный сигнальный домен молекулы, из которой он получен, или его функциональный фрагмент или производное. CAR по данному изобретению могут содержать один или большее количество костимуляторных доменов.

[0093] Термин «сTCR» относится к последовательности, кодирующей нуклеиновую кислоту TCR дикого типа, и соответствующему белку TCR дикого типа, связанному с антигенсвязывающим доменом. сTCR используются в некоторых вариантах осуществления и контрольных контролях. Например, сTCR, имеющий связывающий

домен CD19 и CD19-CAR (содержащий мутантную цепь TCR и связывающий домен CD19), будут иметь разные аффинности связывания экспрессии и/или различия с антигеном-мишенью.

[0094] Термин «цитозольный» или «цитоплазматический» относится к агенту, например белку, который находится в цитоплазме клетки в ее зрелой форме. Цитозольный белок может транслоцироваться в ядро, но не является трансмембранным белком и не секретируется вне клетки. Иллюстративным цитозольным белком является vFLIP K13.

[0095] Термин «дегенеративные нарушения» относится к заболеванию, которое является результатом непрерывного процесса, основанного на дегенеративных клеточных изменениях, затрагивающих ткани или органы, которые со временем будут все больше ухудшаться, будь то из-за нормального физического износа или выбора образа жизни, такого как физические упражнения или привычки приема пищи. Иллюстративные дегенеративные заболевания включают болезнь Альцгеймера, болезнь Шарко-Мари-Тута, болезнь Крейцфельда-Якоба, атаксию Фридрейха, сахарный диабет (тип II) и атеросклероз.

[0096] «Полученный/происходящий из», как этот термин используется в данном документе, указывает на связь между первой и второй молекулой. Это в целом относится к структурному сходству между первой молекулой и второй молекулой и не имеет дополнительного значения, или включает в себя процесс или ограничение источника на первые молекулы, который является производными от второй молекулы. Например, в случае антигенсвязывающего домена, который получен из молекулы антитела, антигенсвязывающий домен сохраняет достаточную структуру антитела, которая выполняет требуемую функцию, а именно способность связываться с антигеном. Это не имеет дополнительного значения, или не включает в себя ограничение какого - либо конкретного способа получения антитела, *например*, это не означает, что, чтобы обеспечить антиген - связывающий домен, следует начать с последовательности антитела и удалить нежелательные последовательности, или вводить мутации для получения антигенсвязывающего домена.

[0097] «Молекула димеризации », как этот термин используется в данном документе, относится к молекуле, которая способствует ассоциации первого домена-переключателя со вторым доменом-переключателем. В вариантах осуществления молекула димеризации не возникает естественным образом у субъекта или не встречается в концентрациях, которые могут привести к значительной димеризации. В вариантах осуществления молекула димеризации представляет собой малую молекулу, *например*, рапамицин или рапалог, например, RAD001, римидуцид или AP20187. Римидуцид (AP1903) является липидопроницаемым аналогом такролимуса с гомодимеризующей активностью. Римидуцид гомодимеризует аналог человеческого белка FKBP12 (Fv), который содержит одну кислотную замену (Phe36Val). Римидуцид используется для гомодимеризации Fv-содержащих доменов, связывающих лекарственных средства, не встречающегося в природе иммунного рецептора, что приводит к активации нижних

сигналов во время клеточной терапии. Римидуцид может применяться в дозе около 0,01-1 мг/кг и имеет EC 50 в культуре клеток около 0,1 нМ. AP20187 можно вводить в дозе около 2-10 мг/кг/день в однократной или многократной дозировке.

[0098] Фраза «заболевание, ассоциированное с экспрессией целевого антигена» или «ассоциированный с заболеванием антиген», как описано в данном документе, включает, но не ограничивается этим, заболевание, связанное с экспрессией целевого антигена, как описано в данном документе, или состояние, связанное с клетками, которые экспрессируют мишень описанный в данном документе антиген, включающий, *например*, пролиферативные заболевания, такие как рак или злокачественное новообразование, или предраковое состояние, такое как миелодисплазия, миелодиспластический синдром или пре-лейкоз; или диагноз, не связанный с раком, связанный с клетками, которые экспрессируют целевой антиген, как описано в данном документе. В одном аспекте рак, связанный с экспрессией опухолевого антигена, как описано в данном документе, представляет собой гематологический рак. В другом аспекте рак, связанный с экспрессией опухолевого антигена, как описано в данном документе, представляет собой солидный/твердый рак. Другие заболевания, связанные с экспрессией опухолевого антигена, описанного в данном документе, включают, но не ограничиваются ими, атипичные и/или неклассические раковые заболевания, злокачественные новообразования, предраковые состояния или пролиферативные заболевания, связанные с экспрессией опухолевого антигена, как описано в данном документе. Показания, не связанные с раком, связанные с экспрессией целевого антигена, как описано в данном документе, включают, но не ограничиваются ими, *например*, аутоиммунное заболевание (*например*, волчанку), воспалительные расстройства (аллергия и астма) и трансплантацию. В некоторых вариантах осуществления клетки-антигены, экспрессирующие мишень, экспрессируют или в любое время экспрессируют мРНК, кодирующую антиген-мишень. В другом варианте осуществления клетки-мишени, экспрессирующие антиген, продуцируют белок-антиген-мишень (*например*, дикого типа или мутант), и белок-антиген-мишень может присутствовать на нормальных уровнях или сниженных уровнях. В другом варианте осуществления клетки-мишени, экспрессирующие антиген, продуцировали определяемые уровни белка антигена-мишени в определенное время и впоследствии практически не продуцировали детектируемые уровни белка антигена-мишени.

[0099] Термин «заболевание, на которое нацелены генетически модифицированные клетки», как он используется в данном документе, охватывает нацеливание на любую клетку, вовлеченную любым образом в любое заболевание, генетически модифицированными клетками по данному изобретению, независимо от того, нацелены ли генетически модифицированные клетки на пораженные клетки или здоровые клетки для осуществления полезного результата терапевтического воздействия. Генетически модифицированные клетки включают, но не ограничиваются ими, генетически модифицированные Т клетки, НК-клетки, гемопоэтические стволовые клетки, плюрипотентные эмбриональные стволовые клетки или эмбриональные стволовые клетки.

Генетически модифицированные клетки экспрессируют обычные CAR и новые остовы, содержащие обычные CAR с вспомогательными модулями по данному изобретению, в которых CAR могут нацеливаться на любой из антигенов, экспрессируемых на поверхности клеток-мишеней. Примеры антигенов, на которые можно воздействовать, включают, но не ограничиваются ими, антигены, экспрессируемые на В-клетках; антигены, экспрессируемые на карциномах, саркомах, лимфомах, лейкозах, опухолях половых клеток и бластомах; антигены экспрессируемые на различных иммунных клетках; и антигены, экспрессируемые на клетках, связанных с различными гематологическими заболеваниями, аутоиммунными заболеваниями и/или воспалительными заболеваниями. Другие антигены, которые могут быть нацелены, будут очевидны для специалистов в данной области и могут быть нацелены на CAR согласно изобретению в связи с их альтернативными вариантами осуществления.

[00100] Термин «константа диссоциации (Kd)» определяется как константа равновесия диссоциации взаимодействия рецептор-лиганд.

[00101] Используемый в данном документе термин «разнообразный набор неприродных иммунных рецепторов» или «разнообразный набор SIR» или «разнообразный набор CAR» относится к множеству неприродных иммунных рецепторов, имеющих один и тот же связывающий домен, связанный с разнообразным набором константных цепей или «цепей» Т-клеточного рецептора, где каждая конструкция, содержащая связывающий домен и разные константные цепи или остов Т-клеток, обеспечивают разнообразный диапазон связывания с целевым антигеном и/или различные уровни экспрессии. Например, в зависимости от состава мутации константного домена (*например*, мутанта TCRA+ TCRb), аффинность связывания домена связывания с его мишенью варьируется. В некоторых вариантах осуществления SIR по данному изобретению (одноцепочечный или гетеродимер) содержит аффинность связывания, которая больше, чем у TCR дикого типа (*например*, сTCR) с тем же доменом связывания. В одном варианте осуществления SIR имеет более высокий уровень экспрессии, чем сTCR по меньшей мере, от 1,25 до примерно 10000 раз выше (и любое число между ними), где SIR и сTCR отличаются только мутацией в домене TCR. В другом варианте осуществления SIR обладает аффинностью связывания с мишенью, которая по меньшей мере в 1,5 раза выше, примерно в 10000 раз выше, чем сTCR, имеющий домен связывания с тем же антигеном. В еще одном варианте осуществления SIR обладает более высокой аффинностью связывания, чем сTCR, с тем же антигеном, но меньше, чем химерный антигенный рецептор (CAR), имеющий тот же домен связывания. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения связывание эффекторной клетки, экспрессирующей SIR, с антигеном - мишенью составляет по меньшей мере в 1,25 раза больше, чем связывание эффекторной клетки экспрессирующей соответствующий сTCR на, но менее чем в 100000 раз больше, чем связывание соответствующего сTCR. В некоторых вариантах осуществления антиген - связывающий домен имеет константу диссоциации (K_D, отражающий его аффинность связывания) от примерно от 10⁻⁴ М до 10⁻⁸ М. В

некоторых вариантах осуществления, антиген-связывающий домен связывается с одним или несколькими из указанных выше антигенов. В некоторых вариантах осуществления антиген - связывающий домен имеет K_D в диапазоне примерно от 10^{-4} М до 10^{-8} М, *например*, примерно от 10^{-5} М до 10^{-7} М, *например*, примерно от 10^{-5} М до 10^{-6} М, для антигена - мишени. В одном варианте осуществления аффинность связывания антигенсвязывающего домена по меньшей мере в пять раз, в 10, 20, 30, 50, 100 или 1000 раз меньше, чем у эталонного антитела. В одном варианте осуществления кодированный антигенсвязывающий домен обладает аффинностью связывания по меньшей мере, в 5 раз меньшей, чем у эталонного антитела. В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело представляет собой антитело, из которого происходит антигенсвязывающий домен. Например, в описании рассматривается разнообразная популяция SIR против конкретной антигенной мишени, которая может быть сконструирована и подвергнута скринингу на основе оптимизации кодонов последовательности нуклеиновой кислоты и/или мутации в цепи TCR для стимулирования спаривания или экспрессии и/или использования линкера между доменом связывания и доменом TCR.

[00102] Используемый в данном документе термин «эпитоп» определяется как часть антигена, способного вызывать иммунный ответ, или часть антигена, которая связывается с антителом или фрагментом антитела. Эпитопы могут быть белковой последовательностью или подпоследовательностью.

[00103] Термин «вектор экспрессии» относится к вектору, содержащему рекомбинантный полинуклеотид, содержащий последовательности контроля экспрессии, функционально связанные с нуклеотидной последовательностью, которая должна быть экспрессирована. Вектор экспрессии содержит достаточное количество цис-действующих элементов для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут поставляться клеткой-хозяином или в системе экспрессии *in vitro*. Векторы экспрессии включают все те, которые известны в данной области, включая космиды, плазмиды (*например*, голые или содержащиеся в липосомах) и вирусы (*например*, лентивирус, ретровирус, аденовирус и аденоассоциированный вирус), которые содержат рекомбинантный полинуклеотид.

[00104] Термин «функциональная часть» при использовании в отношении CAR относится к любой части или фрагменту CAR, причем эта часть или фрагмент сохраняет биологическую активность CAR, частью которого он является (родительский CAR). Функциональные части включают, например, те части CAR, которые сохраняют способность распознавать клетки-мишени или обнаруживать, лечить или предотвращать заболевание в той же степени, той же степени или в большей степени, что и родительский CAR. По отношению к родительскому CAR функциональная часть может включать, например, около 10%, 25%, 30%, 50%, 68%, 80%, 90%, 95% или более от родительского CAR.

[00105] «Генетически модифицированные клетки», «перенаправленные клетки», «генно-инженерные клетки» или «модифицированные клетки», используемые в данном документе, относятся к клеткам, которые экспрессируют CAR по данному изобретению. В

некоторых вариантах осуществления генетически модифицированные клетки содержат векторы, которые кодируют CAR. В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированные клетки содержат векторы, которые кодируют CAR и одну или большее количество вспомогательных молекул в одном и том же векторе. В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированные клетки содержат первый вектор, который кодирует CAR, и второй вектор, который кодирует вспомогательную молекулу. В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированные клетки содержат первый вектор, который кодирует CAR, и второй вектор, который кодирует более одной вспомогательной молекулы. В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированные клетки содержат первый вектор, который кодирует CAR, и второй вектор, который кодирует первую вспомогательную молекулу, и третий вектор, который кодирует вторую вспомогательную молекулу.

[00106] Термин «шарнирная область» (HR) в контексте данного описания относится к гидрофильной области, которая находится между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом. Шарнирные области включают, но не ограничиваются ими, Fc-фрагменты антител или их фрагменты или производные, шарнирные области антител или их фрагментов или производных, области CH2 антител, области CH3 антител, последовательности искусственных спейсеров или их комбинации. Примеры шарнирных областей включают, но не ограничиваются ими, шарнир CD8a и искусственные спейсеры, сделанные из полипептидов, которые могут быть такими же маленькими, как, например, домены Gly3 или CH1 и CH3 IgG (такие как человеческий IgG4). В некоторых вариантах осуществления шарнирная область представляет собой любую одну или большее количество из (i) шарнирной области CH2 и CH3- IgG4, (ii) шарнирной области IgG4, (iii) шарнирной области и CH2 IgG4, (iv) шарнирной области CD8a, (v) шарнирной области CH2 и CH3 IgG1, (vi) шарнирной области IgG1 или (vi) шарнирной области CH2 IgG1. Другие шарнирные области будут очевидны для специалистов в данной области техники и могут использоваться в связи с альтернативными вариантами осуществления данного изобретения.

[00107] Термин «иммунное расстройство» относится к заболеванию, характеризующемуся дисфункцией иммунной системы. Аутоиммунное заболевание - это состояние, возникающее в результате аномального иммунного ответа на нормальную часть тела. Существует не менее 80 видов аутоиммунных заболеваний.

[00108] «Иммунная клетка» в контексте данного описания относится к клеткам иммунной системы млекопитающих, включая, но не ограничиваясь ими, антигенпрезентирующие клетки, В-клетки, базофилы, цитотоксические Т клетки, дендритные клетки, эозинофилы, гранулоциты, хелперные Т клетки, лейкоциты, лимфоциты, макрофаги, тучные клетки, клетки памяти, моноциты, природные клетки-киллеры, нейтрофилы, фагоциты, плазматические клетки и Т клетки.

[00109] «Иммунная эффекторная клетка», как этот термин используется в данном документе, относится к клетке, которая участвует в иммунном ответе, *например*, в

стимуляции иммунного эффекторного ответа. Примеры иммунных эффекторных клеток включают Т клетки, *например* альфа/бета Т клетки и гамма/дельта Т клетки, В-клетки, натуральные киллеры (NK), натуральные киллеры Т (NKT), тучные клетки и фагоциты, полученные из миелоида.

[00110] «Иммунная эффекторная функция» или «иммунный эффекторный ответ», «эффекторная функция» относится к специализированной функции дифференцированной клетки. Например, эффекторной функцией Т клетки может быть цитолитическая активность или хелперная активность, включая секрецию цитокинов. Например, иммунная эффекторная функция или ответ относится к свойству Т или NK-клетки, которое способствует уничтожению или ингибированию роста или пролиферации клетки-мишени. В случае Т-клеток первичная стимуляция и костимуляция являются примерами иммунной эффекторной функции или ответа. В случае антигенпрезентирующих клеток (*например*, дендритных клеток) презентация антигена и секреция цитокинов являются примерами эффекторных функций.

[00111] «Иммунный ответ», как используется в данном документе, относится к видам иммунитета, включая, но не ограничиваясь ими, врожденный иммунитет, гуморальный иммунитет, клеточный иммунитет, иммунитет воспалительного ответа, приобретенный (адаптивный) иммунитет, аутоиммунитет и/или сверхактивный иммунитет.

[00112] «Внутриклеточный сигнальный домен» (ISD - intracellular signaling domain) или «цитоплазматический домен» в том смысле, в котором этот термин используется в данном документе, относится к внутриклеточной сигнальной части молекулы. Внутриклеточный сигнальный домен генерирует сигнал, который способствует иммунной эффекторной функции клетки. Примеры иммунной эффекторной функции включают цитолитическую активность и вспомогательную активность, включая секрецию цитокинов. Примеры доменов, которые передают сигнал эффекторной функции, включают, но не ограничиваются ими, z-цепь рецепторного комплекса Т-клеток или любой из его гомологов (*например*, h-цепь, FcεR1g и b-цепи, цепь MB1 (Iga), B29 (Igb) цепь и *т. д.*), зета-цепь CD3 человека, полипептиды CD3 (D, d и e), тирозинкиназы семейства syk (Syk, ZAP 70 и *т. д.*), тирозинкиназы семейства src (Lck, Fyn, Lyn и *т. д.*) и другие молекулы, участвующие в трансдукции Т-клеток, такие как CD2, CD5 и CD28. Другие внутриклеточные сигнальные домены будут очевидны для специалистов в данной области техники и могут использоваться в связи с альтернативными вариантами осуществления изобретения.

[00113] В другом варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать первичный внутриклеточный сигнальный домен. Иллюстративные первичные внутриклеточные сигнальные домены включают домены, полученные из молекул, ответственных за первичную стимуляцию или антиген-зависимое моделирование. В другом варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать костимуляторный внутриклеточный домен. Иллюстративные

костимуляторные внутриклеточные сигнальные домены включают домены, полученные из молекул, ответственных за костимуляторные сигналы или антиген-независимую стимуляцию. Например, первичный внутриклеточный сигнальный домен может содержать цитоплазматическую последовательность CD3z, а костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен может содержать цитоплазматическую последовательность из корецептора или костимулирующей молекулы, такой как CD28 или 41BB.

[00114] Первичный внутриклеточный сигнальный домен может содержать сигнальный мотив, который известен как иммунорецепторный мотив активации на основе тирозина или ITAM. Примеры ITAM, содержащих первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, включают, но не ограничиваются ими, последовательности, полученные из CD3-зета, общей FeR-гаммы (FCER1G), Fe-гамма RIIa, FeR-бета (Fe Epsilon R1b), CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD79a, CD79b, DAP10 и DAP12.

[00115] Используемый в данном документе термин «изолированный» относится к молекулам, биологическим или клеточным материалам, которые по существу не содержат других материалов. В одном аспекте термин «изолированный» относится к нуклеиновой кислоте, такой как ДНК или РНК, или белку или полипептиду (*например*, антителу или его производному), или клетке или клеточной органелле, или ткани или органу, отделенным от других ДНК или РНК, или белку или полипептиду, или клетке, или клеточной органелле, или ткани или органу, соответственно, которые присутствуют в природном источнике. Термин «выделенный» также относится к нуклеиновой кислоте или пептиду, которые по существу не содержат клеточного материала, вирусного материала или культуральной среды, если они получены методами рекомбинантной ДНК, или химическими предшественниками или другими химическими веществами, когда они синтезированы химически. Кроме того, подразумевается, что «выделенная нуклеиновая кислота» включает фрагменты нуклеиновой кислоты, которые не встречаются в природе в виде фрагментов и не были бы обнаружены в естественном состоянии. Термин «выделенный» также используется в данном документе для обозначения полипептидов, которые выделены из других клеточных белков, и предназначен для охвата как очищенных, так и рекомбинантных полипептидов. Термин «изолированный» также используется в данном документе для обозначения клеток или тканей, которые выделены из других клеток или тканей, и предназначен для охвата как культивируемых, так и сконструированных клеток или тканей.

[00116] Используемый в данном документе термин «линкер» (также «линкерный домен» или «линкерная область») относится к олиго или полипептиду (или олиго, кодирующему полипептид), который объединяет два или более доменов или областей полинуклеотида CAR или полипептид, соответственно, раскрытый в данном документе. Линкер может иметь длину от 1 до 500 аминокислот или от 3 до 1500 нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах осуществления «линкер» является разрезаемым или

неразрезаемым. Если не указано иное, термин «линкер», используемый в данном документе, означает неразрезаемый линкер. Указанные неразрезаемые линкеры могут состоять из гибких остатков, которые обеспечивают свободу движения соседних белковых доменов относительно друг друга. Неограничивающие примеры таких остатков включают глицин и серин. В некоторых вариантах осуществления линкеры включают негибкие остатки. Примеры расщепляемых линкеров включают линкеры 2A (например, T2A), линкеры, подобные 2A, или их функциональные эквиваленты и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления линкеры включают пикорнавирусный 2A-подобный линкер, последовательности CHYSEL свиного тешовируса (P2A), вирус *Teasa Асинья* (T2A) или их комбинации, варианты и функциональные эквиваленты. В некоторых вариантах осуществления линкерные последовательности могут содержать мотив, который приводит к расщеплению между 2A глицином и 2B пролином (см., например, последовательность T2A, SEQ ID NO: 4839 и 4840, С-концевой Gly-Pro). Нуклеиновые последовательности нескольких иллюстративных расщепляемых линкеров представлены в SEQ ID NO: 925 - SEQ ID NO: 930, а аминокислотные последовательности нескольких иллюстративных линкеров представлены в SEQ ID NO: 4838 - SEQ ID NO: 4843. Другие разрезаемые линкеры, которые могут быть применены в данном документе, легко понятны специалистам в данной области.

[00117] В одном варианте осуществления мотив Ser-Gly-Ser-Gly (SGSG) (SEQ ID NO: 931-32) также добавляется перед последовательностями разрезаемого линкера для повышения эффективности разрезания. Потенциальным недостатком расщепляемых линкеров является возможность того, что маленькая метка 2A, оставленная на конце N-концевого белка, может влиять на функцию белка или вносить вклад в антигенность белков. Чтобы преодолеть это ограничение, в некоторых вариантах осуществления сайт разрезания фурином (RAKR) (SEQ ID NO: 933-935) добавляют выше мотивов SGSG, чтобы облегчить разрезание остаточного пептида 2A после трансляции.

[00118] Используемый в данном документе термин «гибкий полипептидный линкер» относится к пептидному линкеру, который состоит из аминокислот, таких как остатки глицина и/или серина, используемые по отдельности или в комбинации, для связывания полипептидных цепей вместе (например, переменных областей тяжелой и легкой цепей вместе). В одном варианте осуществления гибкий полипептидный линкер представляет собой линкер Gly/Ser и содержит аминокислотную последовательность (Gly-Gly-Gly-Ser)_n, (SEQ ID NO: 4191-4192), где n представляет собой положительное целое число, равное или большее чем 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 варианте осуществления гибкие полипептидные линкеры включают, но не ограничиваются ими, (Gly₄ Ser)₄ или (Gly₄ Ser)₃ (SEQ ID NO: 4193 или 4194). Также в объем раскрытия включены линкеры, описанные в WO 2012/138475, включенной в данный документ посредством ссылки).

[00119] 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-хозяина, поэтому они являются одним из наиболее эффективных методов вектора доставки генов. HIV, SIV и FIV являются примерами лентивирусов.

[00120] Термин «лентивирусный вектор» относится к вектору, полученному по меньшей мере, из части генома лентивируса, включая, в частности, самоактивирующийся лентивирусный вектор, как предоставлено в Milone et al, Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009). Другие примеры лентивирусных векторов, которые можно использовать в клинике, включают, но не ограничиваются ими, *например*, технологию доставки генов LENTIVECTOR[®] от Oxford BioMedica, векторную систему LENTIMAX[™] от Lentigen и тому подобное. Неклинические типы лентивирусных векторов также доступны и будут известны специалисту в данной области. Другими примерами лентивирусных векторов являются pLENTI-EF1 α (SEQ ID NO: 3837), pLENTI-EF1 α -DWPRE (SEQ ID NO: 3838), pCCLc-MNDU3-WPRE (SEQ ID NO: 7779) и pCCLc-MNDU3-Eco-Nhe -Sal-WPRE (SEQ ID NO: 7780). pLenti-EF1 α -DWPRE был получен из вектора pLENTI-EF1 α путем делеции последовательности WPRE. Внутренний фрагмент Sac II был удален из промотора EF1 α для генерации промотора EF1 α (EF1 α) -D-SACII (SEQ ID NO: 3842). В иллюстративном варианте осуществления фрагмент нуклеиновой кислоты, кодирующий CAR, CAR плюс вспомогательный модуль (и), или вспомогательный модуль может быть клонирован между сайтами Nhe I и Sal I, присутствующих в Plenti-EF1 α и pCCLc-MNDU3-Eco-Nhe-Sal-WPRE векторах с использованием способов, известных в данной области.

[00121] Используемый в данном документе термин «млекопитающее» относится к любому представителю класса *млекопитающих*, включая, помимо прочего, людей и нечеловеческих приматов, таких как шимпанзе и другие виды обезьян и человекообразных обезьян; сельскохозяйственные животные, такие как крупный рогатый скот, овцы, свиньи, козы и лошади; домашние млекопитающие, такие как собаки и кошки; лабораторные животные, включая грызунов, таких как мыши, крысы и морские свинки, и тому подобное. Термин не обозначает конкретный возраст или пол. Таким образом, взрослые и новорожденные субъекты, а также плоды в утробе, будь то мужского пола или женского, должны быть включены в объем этого термина.

[00122] Используемый в данном документе термин «нагая ДНК (naked DNA)» относится к ДНК, кодирующей CAR, клонированный в подходящем экспрессирующем векторе в правильной ориентации для экспрессии. Вирусные векторы, которые можно использовать, включают, но не ограничиваются ими, лентивирусные векторы SIN, ретровирусные векторы, векторы пенистых вирусов, векторы аденоассоциированных вирусов (AAV), гибридные векторы и/или транспозоны плазмиды (например, транспозонную систему спящая красавица) или вектор на основе системы интегразы. Другие векторы, которые можно использовать в связи с альтернативными вариантами осуществления данного изобретения, будут очевидны для специалистов в данной области техники.

[00123] Термин «нативный» или «встречающийся в природе» или «эндогенный»,

используемый в данном документе, относится к гену, белку, нуклеиновой кислоте (*например, ДНК, РНК и т. д.*) Или их фрагменту, который является нативным для клетки или естественным образом экспрессируется в клетке. Таким образом, нативный или эндогенный полипептид цепи TCR α Т клетки состоит из вариабельного домена (V α), соединенного с константной цепью TCR α . Нативный или эндогенный полипептид предшественника цепи TCR α также состоит из аминоконцевого сигнального пептида, который отщепляется от зрелого полипептида.

[00124] Существенный модулятор NF-Карра-В (NEMO - NF-Карра-В Essential Modulator) относится к каркасному белковому компоненту комплекса киназы I κ B, необходимому для активации NF- κ B. NF- κ B является фактором транскрипции, который контролирует воспаление, пролиферацию клеток и апоптоз.

[00125] «Путь NF- κ B» или «путь передачи сигналов NF- κ B» относится к пути передачи сигнала, который приводит к ядерной транслокации субъединиц NF- κ B и транскрипционной активации генов, чувствительных к субъединице NF- κ B. NF- κ B относится к семейству транскрипционных факторов, которые участвуют в регулируемой экспрессии нескольких генов, участвующих в воспалительном и иммунном ответе. Пять известных членов этого семейства были охарактеризованы на сегодняшний день и включают в себя c-Rel, NF- κ p B1 (p50 и его предшественник p105), NF- κ B2 (p52 и его предшественник p105), p65 (RelA) и RelB. Хотя многие димерные формы NF- κ B были описаны, классический NF- κ B комплекс представляет собой гетеродимер p65/RelA и p50 субъединиц и обнаруживается в большинстве клеток в сочетании с семейством белков - ингибиторов, называемым I κ B, из которых наиболее распространенным является I κ B α . В классическом пути NF- κ B стимуляция рядом цитокинов, таких как TNF α и IL-1, приводит к активации комплекса из нескольких субъединиц I κ B киназы (IKK), который содержит две каталитические субъединицы, IKK1/IKK α и IKK2/IKK β , и регуляторная субъединица NEMO/IKK γ . Активирование IKK комплекса приводит к индуцибельному фосфорилированию I κ B белков и их последующей деградации, тем самым высвобождая NF- κ B от их ингибирующего влияния. После освобождения, NF- κ B свободно мигрирует в ядро и связывается с промотором специфических генов, обладающих его когнатным сайтом связывания. Транскрипционная активность димеров NF- κ B в ядре дополнительно модифицируется их фосфорилированием. Альтернативный (или неканонический) путь активации NF- κ B, который включает в себя протеасому-опосредованную преработку P100/NF- κ B2 в p52 субъединицу, был описан.

[00126] «NF- κ B стимулирующая молекула» или «NF- κ B стимулятор» или «NF- κ B активатор» относится к подмножеству вспомогательных молекул, которые стимулируют активность сигнального пути NF- κ B или активность/экспрессию нижестоящих генов-мишеней сигнального пути NF- κ B. В некоторых вариантах осуществления активатор NF- κ B представляет собой не встречающийся в природе активатор NF- κ B. Примером не встречающегося в природе активатора NF- κ B является hNEMO-K277A. В одном варианте осуществления NF- κ B стимулирующая молекула или стимулятор NF- κ B представляет

собой селективный стимулятор NF-κB или селективный активатор NF-κB. «Селективный активатор NF-κB» или «селективный стимулятор NF-κB», как описано в данном документе, относится к агенту, который селективно активирует сигнальный путь NF-κB без какой-либо или минимальной активации других сигнальных путей. В одном варианте осуществления селективный активатор NF-κB активирует сигнальный путь NF-κB без или с минимальной активацией одного или большего количества сигнальных путей, выбранных из группы АКТ, PI3K, JNK, p38 киназы, ERK, JAK/STAT и передачи сигналов интерферона пути. В одном варианте осуществления селективный активатор NF-κB активирует путь передачи сигналов NF-κB без активации или минимальной активации пути передачи сигналов АКТ. В одном варианте осуществления селективный активатор NF-κB активирует путь передачи сигналов NF-κB без активации или минимальной активации пути передачи сигналов АКТ. В одном варианте осуществления селективный активатор NF-κB активирует сигнальный путь NF-κB без активации или минимальной активации сигнального пути PI3K. В одном варианте осуществления селективный активатор NF-κB активирует путь передачи сигналов NF-κB без активации или минимальной активации пути передачи сигналов ERK. В одном варианте осуществления селективный активатор NF-κB активирует путь передачи сигналов NF-κB без активации или минимальной активации пути передачи сигналов JNK. В одном варианте осуществления селективный активатор NF-κB активирует сигнальный путь NF-κB без активации или минимальной активации сигнального пути киназы p38. В одном варианте осуществления селективный активатор NF-κB активирует сигнальный путь NF-κB без активации или минимальной активации сигнального пути JAK/STAT. В одном варианте осуществления селективный активатор NF-κB активирует путь передачи сигналов NF-κB без активации или минимальной активации пути передачи сигналов интерферона. В данной области известен ряд методов измерения активации сигнальных путей NF-κB, включая, но не ограничиваясь ими, измерение фосфорилированного IκBα, фосфорилированного p65/RelA, общего IκBα, ядерной транслокации p65, активацию генов, чувствительных к NF-κB анализ изменения электрофоретической подвижности (EMSA - electrophoretic mobility -shift assay) и анализ репортера на основе NF-κB *и т. д.* Эти методы могут быть применены в способах по данному изобретению либо по отдельности, либо в комбинации для идентификации селективных активаторов пути NF-κB. В данной области техники известен ряд способов измерения активации сигнальных путей (*например*, АКТ, PI3K, JNK, p38-киназа, ERK, JAK/STAT и сигнальные пути интерферона), включая, но не ограничиваясь ими, измерение фосфорилирования различные киназы и нижестоящие субстраты, принадлежащие к разным путям, ядерная транслокация нижестоящих факторов транскрипции, активация нижестоящих чувствительных генов, анализ изменения электрофоретической подвижности (EMSA) и анализ репортеров на основе люциферазы *и т. д.* Эти анализы могут быть применены в способах раскрытия либо по отдельности, либо в комбинации для выбора селективных активаторов сигнального пути NF-κB. Селективный стимулятор NF-κB специфически

активирует NF-κB по сравнению с другими дополнительными молекулами, такими как 41BB. Молекула, стимулирующая NF-κB, включая селективный активатор NF-κB, обладает одним или несколькими из следующих эффектов: (i) продлевает продолжительность жизни Т-клеток, *например*, клеток CAR-T или TCR-T, (ii) стимулирует пролиферацию Т-клеток, (iii) защищает Т клетки, *например*, клетки CAR-T, от апоптоза, (iv) задерживает старение Т-клеток, *например*, клетки CAR-T или клетки TCR-T (v) задерживает истощение Т-клеток *например*, клетки CAR-T или клетки TCR-T, (vi) задерживает терминальную дифференцировку Т-клеток, (vii) способствует продукции цитокинов, таких как IL2, Т клетками, (viii) способствует размножению Т-клеток *in vivo*, включая клетки CAR-T и клетки TCR-T, (ix) способствует сохранению *in vivo* Т-клеток, включая клетки CAR-T и клетки TCR-T, (x) улучшает активность *in vivo* (*например*, противоопухолевую активность) Т клетки, включая клетки CAR-T и TCR-T. Молекула, стимулирующая NF-κB, включая селективный активатор NF-κB, может экспрессироваться в клетках, отличных от Т-клеток, таких как антигенпрезентирующие клетки, *например* дендритные клетки. Молекула, стимулирующая NF-κB, включая селективный активатор NF-κB, может быть использована для усиления презентации антигена, продукции цитокинов и иммунного ответа, генерируемого антигенпрезентирующими клетками. Молекула, стимулирующая NF-κB, включая селективный активатор NF-κB, может иметь вирусное или невирусное (*например*, человеческое) происхождение. Молекула, стимулирующая NF-κB, включая селективный активатор NF-κB, может экспрессироваться в клетке временно или стабильно. Молекула, стимулирующая NF-κB, включая селективный активатор NF-κB, может экспрессироваться в клетке конститутивным или индуцибельным образом. Молекула, стимулирующая NF-κB, включая селективный активатор NF-κB, может экспрессироваться в клетке при слиянии с доменом-переключателем, *например*, тандемными копиями домена FKBP12v36. Типичный домен-переключатель, содержащий молекулы, стимулирующие NF-κB, представлен в SEQ ID NO: 973-977, 1006-1009, 7763-7767 и 7781-7782 (**Таблица 7**). NF-κB стимулирующая молекула, включая селективный активатор NF-κB, может экспрессироваться из вектора, содержащего кодирующую последовательность для CAR/TCR, или может присутствовать в другом векторе. Например, в некоторых вариантах осуществления векторы, содержащие полинуклеотиды, кодирующие CAR/TCR, дополнительно содержат полинуклеотиды, кодирующие вирусные и клеточные сигнальные белки, которые являются NF-κB стимулирующей молекулой или селективным активатором NF-κB, которые (i) увеличивают продолжительность жизни Т-клеток, *например*, клетки CAR-T или TCR-T, (ii) стимулируют пролиферацию Т-клеток, (iii) защищают Т-клетки, *например*, клетки CAR-T, от апоптоза, (iv) задерживают старение Т-клеток, *например*, клеток CAR-T или TCR-T-клеток (v) задерживают истощение Т-клеток, *например* CAR-T-клеток или TCR-T-клеток, (vi) задерживают терминальную дифференцировку Т-клеток, (vii) стимулируют выработку цитокинов, таких как IL2, Т клетками (viii) стимулируют экспансию Т-клеток *in vivo*, включая клетки CAR-T и TCR-T, (ix) стимулируют персистенцию Т-клеток *in vivo*,

включая клетки CAR-T и TCR-T, и/или (х) улучшают активность *in vivo* (например, противоопухолевую активность) Т-клеток, включая клетки CAR-T и TCR-T. В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность для NF-κB стимулирующей молекулы связана с кодирующей последовательностью основной цепи CAR олигонуклеотидом, кодирующим разрезаемый линкер. В иллюстративных вариантах осуществления такие стимулирующие молекулы NF-κB включают, но не ограничиваются ими, vFLIP-K13 из вируса герпеса, ассоциированного с саркомой Капоши, оптимизированный по кодонам K13 (K13-opt), мутант NEMO ((например, hNEMO-K277A, hNEMO-K277L, hNEMO-K277A-deltaV249-K255, mNEMO-K270A и *т. д.*), IKK2-S177E-S181E, IKK1-S176E-S180E, MyD88-L265P, TCL-1A и IKK, MTK-1A, MTCР (Таблица 7). В одном варианте осуществления векторы, кодирующие CAR, дополнительно кодируют vFLIP-K13. В другом варианте осуществления векторы, кодирующие CAR, дополнительно кодируют hNEMO-K277A. В некоторых вариантах осуществления NF-κB стимулирующая молекула кодируется вектором, который отличается от вектора, кодирующего CAR, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления эффекторные клетки, содержащие векторы, кодирующие CAR, также содержат векторы, кодирующие NF-κB стимулирующую молекулу. В некоторых вариантах осуществления стимулирующие молекулы NF-κB кодируются путем модификации геномного локуса, кодирующего соответствующий эндогенный белок. Например, одну или большее количество копий гена hNEMO можно модифицировать гомологичной рекомбинацией, чтобы мутировать ее в мутантную форму K277A. Иллюстративные нацеливающие конструкции, которые можно использовать для создания мутации K277A в эндогенном гене NEMO человека, представлены в SEQ ID NO: 7771. Иллюстративные нацеливающие конструкции, которые можно использовать для создания мутации K277A-Delta-V249-K255 в эндогенном гене NEMO человека, представлены SEQ ID NO: 7772. Эти нацеливающие конструкции могут быть введены в Т клетки человека с помощью системы редактирования генов, нацеленной на NEMO, например, CRISP/Cas9 или TALON, с использованием методов, известных в данной области. Иллюстративные последовательности-мишени для NEMO нРНК для *Streptococcus Pyogenes* Cas9 представлены в SEQ ID NO: 7759-7762. В одном варианте осуществления CAR и NF-κB стимулирующая молекула кодируются одним полинуклеотидом. В другом варианте осуществления CAR кодируется первой молекулой нуклеиновой кислоты, а NF-κB стимулирующая молекула кодируется второй молекулой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления NF-κB стимулирующая молекула кодируется более чем одной молекулой нуклеиновой кислоты, в зависимости от количества стимулирующих молекул NF-κB. В некоторых частях раскрытия аббревиатура «CAR/NFκB» используется, чтобы указать, например, клетку, которая экспрессирует как CAR по данному раскрытию, так и NF-κB стимулирующую молекулу (например, специфическую NF-κB стимулирующую молекулу). Например, термин «CAR/NFκB-экспрессирующая Т-клетка» относится к CAR-T-клеткам, имеющим любое количество

возможных различных антигенсвязывающих доменов, которые также экспрессируют, например, NF-κB-специфическую стимулирующую молекулу, выбранную из группы, состоящей из vFLIP-K13 от вируса герпеса ассоциированный с саркомой Капоши, кодон оптимизированный K13 (K13-opt), ч NEMO-K277A, hNEMO-K277A-deltaV249-K555, mNEMO-K270A, IKK2-S177E-S181E, IKK1-S176E -S180E, MyD88-L265P, TCL-1A, МПТС-1, IKK1/IKKα и IKK2/IKKβ, или любую их комбинацию. NF-κB стимулирующая молекула может быть непосредственно связана с цитоплазматическим доменом CAR или может независимо экспрессироваться в клетке. Молекула, стимулирующая NF-κB, может представлять собой молекулу, которая блокирует экспрессию и/или активность ингибитора сигнального пути NF-κB. Например, NF-κB стимулирующая молекула, которая блокирует экспрессию и/или активность ингибитора сигнального пути NF-κB, является генетической (*например*, миРНК, кшРНК, нРНК, TALON или нуклеазой Zn-пальца), химическим или биологическим ингибитором A20. Другие варианты осуществления включают в себя NEMO-слитые конструкции, как NF-κB стимулирующие молекулы (*например*, hNEMO-FKBPχ2, FKBPχ2-hNEMO-L600 и т.д.).

[00127] Используемый в данном документе термин «не встречающийся в природе агент» или «не нативный» или «экзогенный» относится к агенту, который не экспрессируется в клетке естественным путем. Другими словами, не встречающийся в природе агент «сконструирован» для экспрессии в клетке. Не встречающийся в природе агент может представлять собой клонированную версию встречающегося в природе агента. Иллюстративные не встречающиеся в природе агенты включают CAR, SIR, Ab-TCR, TFP, рекомбинантный TCR, NEMO-K277A, vFLIP-K13 и K13-opt. Не встречающийся в природе агент может быть экспрессирован в клетке с использованием методов переноса генов, известных в данной области, таких как перенос генов, опосредованный лентивирусом или ретровирусом. Не встречающийся в природе агент может экспрессироваться в иммунной клетке с использованием экзогенного промотора (*например*, промотора EF1α) или эндогенного промотора (*например*, промотора TCRα). Когда эндогенный ген (*например*, IKK1, IKK2, IKKγ/NEMO) клонируется и эктопически экспрессируется в клетке, он представляет собой еще один пример не встречающегося в природе агента.

[00128] Используемый в данном документе термин «не встречающийся в природе иммунный рецептор» или «экзогенный иммунный рецептор» относится к иммунному рецептору, который не экспрессируется естественным образом в иммунной клетке. Другими словами, не встречающийся в природе иммунный рецептор «спроектирован» для экспрессии в иммунной клетке. Не встречающийся в природе иммунный рецептор может представлять собой клонированную версию встречающегося в природе иммунного рецептора. Альтернативно, не встречающийся в природе иммунный рецептор может представлять собой химерный рецептор, который продуцируется с использованием методов рекомбинантной молекулярной биологии. Иллюстративные не встречающиеся в природе иммунные рецепторы включают CAR, SIR, Ab-TCR, TFP и рекомбинантный

TCR. Не встречающийся в природе иммунный рецептор может быть введен в иммунную клетку с использованием методов переноса генов, известных в данной области, таких как перенос генов, опосредованный лентивирусом или ретровирусом. Не встречающийся в природе иммунный рецептор может быть экспрессирован в иммунной клетке с использованием экзогенного промотора (*например*, промотора EF1 α) или эндогенного промотора (*например*, промотора TCR α).

[00129] Используемый в данном документе термин «не встречающийся в природе антигенсвязывающий домен TCR» или «экзогенный антигенсвязывающий домен TCR» относится к связывающему домену, функционально связанному с константной областью TCR, который является химерным и не встречается в природе, относительно TCR, который встречается в природе. Иными словами, не встречающийся в природе антигенсвязывающий домен TCR «сконструирован» с использованием методов рекомбинантной молекулярной биологии, чтобы функционально связываться с TCR и, кроме того, антигенсвязывающий домен происходит или получен из молекулы, отличной от TCR, который встречается в природе. Антигенсвязывающий домен, который отличается от TCR по природе, включает фрагменты vH и vL антител, фрагменты гуманизированных антител, фрагменты химерных антител, лиганды рецепторов и тому подобное.

[00130] Используемый в данном документе термин «невирусное происхождение» относится к агенту (*например*, белку), который не полностью или частично не кодируется вирусом или имеет любой домен или область из более чем 10 аминокислот (*например*, более чем 15 аминокислот, 20 аминокислот, 25 аминокислот или 50 аминокислот) с более чем 80% (*например*, более 85%, 90%, 95% или 99%) гомологии последовательности с кодируемым вирусом белком. В одном варианте осуществления агент невирусного происхождения имеет человеческое происхождение. В одном варианте осуществления агент невирусного происхождения представляет собой селективный активатор NF- κ B. Иллюстративным агентом невирусного происхождения, который является селективным активатором NF- κ B, является NEMO-K277A человека (SEQ ID NO: 4892).

[00131] Термин «функционально связанный» или «функционально связанный» относится к функциональной связи или ассоциации между первым компонентом и вторым компонентом, так что каждый компонент может быть функциональным. Например, функционально связанный включает в себя связь между регуляторной последовательностью и последовательностью гетерологичной нуклеиновой кислоты, что приводит к экспрессии последней. Например, первая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана со второй последовательностью нуклеиновой кислоты, когда первая последовательность нуклеиновой кислоты находится в функциональном отношении со второй последовательностью нуклеиновой кислоты. В контексте двух полипептидов, которые функционально связаны, первый полипептид функционирует таким образом, чтобы он не зависел от какой-либо связи, и второй полипептид не функционировал, поскольку он не имел бы связи между ними.

[00132] «Процент идентичности» в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов относится к двум или более последовательностям, которые являются одинаковыми. Две последовательности являются «по существу идентичными», если две последовательности имеют определенный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (*например*, 60% идентичности, 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% идентичности по указанной области или, или если не указано, то по всей последовательности), при сравнении и выровнены для максимального соответствия по окну сравнения или определенной области, измеренной с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или путем ручного выравнивания и визуального контроля. Необязательно, идентичность существует в области, длина которой составляет по меньшей мере, около 50 нуклеотидов (или 10 аминокислот) или, более предпочтительно, в области, которая составляет от 100 до 500 или 1000 или более нуклеотидов (или 20, 50, 200 или более аминокислот) в длину.

[00133] Для сравнения последовательностей обычно одна последовательность действует как контрольная последовательность, с которой сравниваются тестовые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей тестовые и эталонные последовательности вводятся в компьютер, при необходимости обозначаются координаты подпоследовательности и программные параметры алгоритма последовательности. Можно использовать параметры программы по умолчанию или указать альтернативные параметры. Затем алгоритм сравнения последовательностей вычисляет процент идентификаторов последовательностей для тестовых последовательностей относительно эталонной последовательности на основе параметров программы. Методы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть проведено, *например*, с помощью алгоритма локальной гомологии Смита и Вотермана, (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482с, с помощью алгоритма выравнивания гомологии Нидлмана-Вунша, (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443, путем поиска метода подобия Пирсона и Липмана, (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444, с помощью компьютеризированных реализаций этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в программном комплексе Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Мэдисон, Висконсин), или путем ручного выравнивания и визуального осмотра (см., *например*, Brent et al., (2003) *Current Protocols in Molecular Biology*).

[00134] Двумя примерами алгоритмов, которые можно использовать для определения процентной идентичности последовательностей и сходства 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. Программное обеспечение для проведения анализов BLAST общедоступно через Национальный центр биотехнологической информации (NCBI).

[00135] Процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями также может быть определен с использованием алгоритма E. Meyers и W. Miller, (1988) *Comput. Appl. Biosci.* 4: 11-17), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), используя Таблицу сбалансированных остатков PAM120, поправка на длину пробела 12 и поправка на пробел 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определена с использованием м Нидлмана-Вунша (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 444-453), который был включен в программу GAP в пакете программного обеспечения GCG (доступно на сайте www.gcg.com), используя либо матрицу Blossom 62, либо матрицу P AM250, и значение промежутка 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и длиной 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

[00136] Термин «полинуклеотид», «нуклеиновая кислота» или «рекомбинантная нуклеиновая кислота» относится к полимерам нуклеотидов, таких как дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) и, где это уместно, рибонуклеиновая кислота (РНК).

[00137] Термины «белок» или «полипептид», которые используются в данном документе взаимозаменяемо, включают одну или большее количество цепочек химических составляющих блоков, называемых аминокислотами, которые связаны друг с другом химическими связями, называемыми пептидными связями.

[00138] Термин «ретровирусный вектор» относится к вектору, полученному по меньшей мере, из части генома ретровируса. Примеры ретровирусного вектора включают MSCVneo, MSCV-pac (или MSCV-puro), MSCV-hygro, которые доступны от Addgene или Clontech.

[00139] Термин «транспозон спящая красавица» или «вектор транспозона спящая красавица» относится к вектору, полученному по меньшей мере из части генома транспозона спящая красавица.

[00140] Термин «одноцепочечная переменная область» или «scFv» относится к слитому белку, содержащему по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий переменную область легкой цепи, и по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, где легкая и переменные области тяжелой цепи непрерывно связаны, *например*, через синтетический линкер, *например* короткий гибкий полипептидный линкер, и способны к экспрессии в виде одноцепочечного полипептида, и при этом scFv сохраняет специфичность интактного антитела, из которого он получен. Если не указано иное, используемый в данном документе scFv может иметь переменные области vL и vH в любом порядке, *например*, относительно N-концевых и C-концевых концов полипептида, scFv может содержать vL-Linker-vH или может содержать Vh-Linker-VL. В этом изобретении scFv также описывается как vL-Gly-Ser-Линкер-vH. Альтернативно, scFv также описывается как (vL+ vH) или (vH+ vL).

[00141] Термин «сигнальный домен» относится к функциональной области белка, которая передает внутри клетки информацию для регулирования клеточной активности

через определенные сигнальные пути путем генерации вторичных мессенджеров или функционирования в качестве эффекторов путем реагирования на такие мессенджеры.

[00142] Термин «синтетический иммунный рецептор» или, альтернативно, «SIR» относится к набору полипептидов, обычно двух в некоторых вариантах осуществления, которые при экспрессии в эффекторной клетке придают клетке специфичность в отношении клетки-мишени, обычно раковой клетки, и генерируют внутриклеточный сигнал. SIR, представляют собой CAR платформы следующего поколения, которые описаны в заявке WO 2018/102795 A1, которая включена в данное описание в качестве ссылки. В иллюстративном варианте осуществления SIR содержит еще один или большее количество антигенсвязывающих доменов (*например*, антитело или фрагмент антитела, лиганд или рецептор), которые связываются с антигенами, как описано в данном документе, и соединены с одним или более константных цепей или областей T -клеточного рецептора через необязательный линкер. В некоторых вариантах осуществления набор полипептидов является смежным друг с другом. В некоторых вариантах осуществления SIR содержит два или более наборов из двух или более полипептидов. Полипептиды каждого набора SIR являются смежными друг с другом (функциональная полипептидная единица 1), но не являются смежными с полипептидами другого набора (функциональная полипептидная единица 2). В некоторых аспектах константные цепи (или области) рецептора T-клеток SIR выбирают из константной цепи альфа рецептора T-клеток человека (TCR-альфа или TCR α или TCRa или hTCR-альфа или hTCR α или hTCRa или C α), человеческого T-клеточного рецептора бета1 (TCR-бета1 или TCR β 1 или TCRb1 или hTCR-бета1 или hTCR β 1 или hTCRb1 или C β 1), человеческого T-клеточного рецептора бета 2 (TCR-бета2 или TCR β 2 или TCRb2 или hTCR-бета2 или hTCR β 2 или hTCRb2 или hTCRb2 или C β 2 также обозначенного TCR-бета, TCR β или TCRb или C β), человеческого альфа пре-T-клеточного рецептора ((preTCR-альфа или preTCR α или preTCRa или preC α), гамма- T-клеточного рецептора человека (TCR-гамма или TCR γ или TCRg или или или hTCR-гамма или hTCR γ или hTCRg или hTCR γ 1 или hTCRgamma1, или C γ), или дельта T-клеточного рецептора человека (TCR-дельта или TCRd или TCR δ или hTCR-дельта или hTCRd или hTCR δ или C δ). В некоторых вариантах осуществления константные цепи TCR SIR кодируются их нуклеотидными последовательностями дикого типа, тогда как в других аспектах константные цепи TCR SIR кодируются нуклеотидными последовательностями, которые не являются диким типом. В некоторых вариантах осуществления константные цепи TCR SIR кодируются их кодон-оптимизированными последовательностями. В некоторых вариантах осуществления константные цепи TCR SIR кодируют полипептидные последовательности дикого типа, тогда как в других вариантах осуществления константные цепи TCR SIR кодируют полипептиды, которые несут одну или большее количество мутаций. В некоторых вариантах осуществления константные цепи TCR SIR кодируются их кодон-оптимизированными последовательностями, которые несут одну или большее количество мутаций. SIR, который содержит антиген - связывающий домен (*например*, ScFv, или

VHН), который нацелен на специфический опухолевый маркер «Х», такие, как те, которые описаны в данном документе, также называется как XSIR или XSIR. Например, SIR, который содержит антигенсвязывающий домен, который нацелен на CD19, называется CD19-SIR или CD19SIR. Константная цепь/домен TCR SIR может быть получена из тех же видов, в которых в конечном итоге будет использоваться SIR. Например, для использования у людей может быть полезным, чтобы константная цепь TCR SIR была получена из константных цепей TCR человека или состояла из них. Однако в некоторых случаях выгодно, чтобы константная цепь TCR была получена из того же вида, в котором SIR будет в конечном счете использоваться, но модифицирована для переноса аминокислотных замен, которые усиливают экспрессию константных цепей TCR. Например, для использования у людей может быть полезным, чтобы константная цепь TCR SIR происходила из константных цепей TCR человека или состояла из них, но в которых определенные аминокислоты заменены соответствующими аминокислотами из константных цепей TCR мыши., Такие константные цепи муринизированного TCR обеспечивают повышенную экспрессию SIR. SIR или его функциональная часть могут включать дополнительные аминокислоты на амино- или карбокси-конце или на обоих концах, причем дополнительные аминокислоты не обнаружены в аминокислотной последовательности TCR или антигенсвязывающего домена, которые составляют SIR. Желательно, чтобы дополнительные аминокислоты не мешали биологической функции или функциональной части SIR, *например*, распознавали клетки-мишени, обнаруживали рак, лечили или предотвращали рак и *т. д.* Более желательно, дополнительные аминокислоты усиливают биологическую активность по сравнению с биологической активности родительского SIR. Последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислоты иллюстративных SIR представлены в SEQ ID NO: 3878-3879 и в **Таблицах 10-11.**

[00143] Термин «стимуляция» относится к первичному ответу, индуцированному связыванием стимулирующей молекулы (*например*, комплекса TCR/CD3) с его родственным лигандом (или антигеном-мишенью), тем самым опосредуя событие сигнальной трансдукции, такое как, но не ограничиваясь этим, передача сигнала через TCR/CD3. Стимуляция может опосредовать изменение экспрессии определенных молекул.

[00144] Термин «стимулирующая молекула» относится к молекуле, экспрессируемой иммунной клеткой (*например*, Т-клеткой, NK-клеткой, В-клеткой), которая обеспечивает цитоплазматическую сигнальную (ые) последовательность (и), которые регулируют активацию иммунной клетки стимулирующим образом для, по крайней мере, некоторых аспектов сигнального пути иммунных клеток. В одном аспекте сигнал является первичным сигналом, который инициируется, например, связыванием комплекса TCR/CD3 с молекулой МНС, загруженным пептидом, и который приводит к опосредованию ответа Т-клеток, включая, но не ограничиваясь, пролиферацию, активацию, дифференцировку и тому подобное. Первичная цитоплазматическая сигнальная последовательность (также называемая «первичным сигнальным доменом»),

которая действует стимулирующим образом, может содержать сигнальный мотив, известный как иммунорецепторный мотив активации на основе тирозина или ITAM. Примеры содержащих ITAM цитоплазматических сигнальных последовательностей, включают, но не ограничиваются ими, последовательности, полученные из CD3-зета, общей FcR-гамма (FCERIG), Fc-гамма RIIa, FcR-бета (Fc epsilon Rib), CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD79a, CD79b, DAPIO и DAP12.

[00145] Предполагается, что термин «субъект» включает живые организмы, у которых может быть вызван иммунный ответ (*например*, любые домашние млекопитающие или человек).

[00146] Используемый в данном документе термин «домен-переключатель» или «домен димеризации», как правило, относится к объекту на основе полипептида, который в присутствии молекулы димеризации связывается с другим доменом-переключателем. Ассоциация приводит к функциональному спариванию первого объекта, связанного, *например*, слитого с первым доменом-переключателем, и второго объекта, связанного, *например*, слитого, со вторым доменом-переключателем. Первый и второй домены-переключатели вобщем называются переключателями димеризации. В вариантах осуществления первый и второй домены-переключатели являются одинаковыми друг с другом, *например*, они представляют собой полипептиды, имеющие одинаковую первичную аминокислотную последовательность, и все вместе упоминаются как переключатели гомодимеризации. В вариантах осуществления переключатель является внутриклеточным. В вариантах осуществления домен-переключатель представляет собой основанный на полипептиде объект, *например*, FKBP (белок, связывающий FK506), а молекула димеризации представляет собой малую молекулу, *например*, AP20187.

[00147] Термины «Т клетка» и «Т-лимфоцит» являются взаимозаменяемыми и используются в данном документе как синонимы. Примеры включают, но не ограничиваются ими, наивные Т клетки («предшественники лимфоцитов»), Т клетки центральной памяти, Т клетки эффекторной памяти, стволовые Т клетки памяти (T_{scm}), Т клетки, полученные из iPSC, синтетические Т клетки или их комбинации.

[00148] Термин «связанный с TCR сигнальный модуль» относится к молекуле, имеющей цитоплазматический иммунорецепторный мотив активации на основе тирозина (ITAM), который является частью комплекса TCR-CD3. TCR-ассоциированные сигнальные модули включают CDγε, CDδε и CD3ζζ.

[00149] «Терапевтические агенты» в контексте данного описания относятся к агентам, которые используются, например, для лечения, ингибирования, предотвращения, смягчения эффектов, снижения тяжести, уменьшения вероятности развития, замедления прогрессирования и/или излечения, болезни. Заболевания, на которые воздействуют терапевтические агенты, включают, но не ограничиваются ими, инфекционные заболевания, карциномы, саркомы, лимфомы, лейкоза, опухоли половых клеток, бластомы, антигены, экспрессируемые на различных иммунных клетках, и антигены, экспрессируемые на клетках, связанных с различными гематологическими заболеваниями

и/или воспалительными заболеваниями.

[00150] «Терапевтический контроль» в контексте данного описания относится к элементу, используемому для контроля активности клетки, экспрессирующей CAR. В некоторых вариантах осуществления терапевтические контроли для контроля активности экспрессирующих CAR клеток по данному изобретению включают любой один или большее количество из усеченного рецептора эпидермального фактора роста (tEGFR), усеченного рецептора эпидермального фактора роста viii (tEGFRviii), усеченного CD30 (tCD30), усеченного BCMA (tBCMA), усеченного CD19 (tCD19), тимидинкиназы, цитозин-деаминазы, нитроредуктазы, ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы, каспазы 8 человека, каспазы 9 человека, индуцибельной каспазы 9, пуриновой нуклеозидфосфорилазы, линамараза/линамарин/глюкозоксидазы, дезоксирибонуклеозидкиназы, пероксидазы хрена (HRP)/индол-3-ацето (IAA), гамма-глутамилцистеинсинтетазы, CD20/альфаCD20, химеры CD34/тимидинкиназы, докс-зависимой каспазы-2, мутантной тимидинкиназы (HSV-TKSR39), системы AP1903/Fas, химерного цитокинового рецептора (CCR), маркер оселекции и их комбинации.

[00151] Термин «терапевтический эффект» относится к биологическому эффекту, который может проявляться различными способами, включая, но не ограничиваясь, *например*, уменьшение объема опухоли, уменьшение количества раковых клеток, уменьшение количества метастазов, увеличение продолжительности жизни, уменьшение пролиферации раковых клеток, снижение выживаемости раковых клеток, снижение титра инфекционного агента, уменьшение числа колоний инфекционного агента, улучшение различных физиологических симптомов, связанных с болезненным состоянием. «Терапевтический эффект» также может проявляться в способности пептидов, полинуклеотидов, клеток и антител предотвращать возникновение заболевания в первую очередь или предотвращать рецидив заболевания.

[00152] Используемый в данном документе термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству фармацевтической композиции, содержащей один или большее количество пептидов, описанных в данном документе, или их мутанта, варианта, аналога или производного, для уменьшения по меньшей мере одного или большего количества симптомов заболевания или расстройства. и относится к достаточному количеству фармакологической композиции для обеспечения желаемого эффекта. Фраза «терапевтически эффективное количество» в контексте данного описания означает достаточное количество композиции для лечения расстройства при разумном соотношении польза/риск, применимом к любому медицинскому лечению.

[00153] Терапевтически или профилактически значимое уменьшение симптома составляет, *например по меньшей мере*, около 10% по меньшей мере, около 20% по меньшей мере, около 30% по меньшей мере, около 40% по меньшей мере, около 50% по меньшей мере, около 60% по меньшей мере, около 70% по меньшей мере, около 80% по меньшей мере, около 90% по меньшей мере, около 100% по меньшей мере, около 125% по меньшей мере, около 150% или более по измеренному параметру по сравнению с

контрольным или необработанным субъектом или состояние субъекта до введения олигопептидов, описанных в данном документе. Измеренные или измеряемые параметры включают клинически обнаруживаемые маркеры заболевания, например повышенные или пониженные уровни биологического маркера, а также параметры, связанные с клинически приемлемой шкалой симптомов или маркеров диабета. Понятно, однако, что общее ежедневное использование композиций и составов, как описано в данном документе, будет решаться лечащим врачом в рамках здравого медицинского суждения. Точное требуемое количество будет варьироваться в зависимости от таких факторов, как тип заболевания, лечение, пол, возраст и вес субъекта.

[00154] Термин «слитые белки рецептора TCR или TFP» относится к платформе CAR следующего поколения, как описано в WO 2016/187349 A1, которая включена в данный документ посредством ссылки. В одном варианте осуществления TFP содержит фрагмент антитела, который специфически связывается с антигеном-мишенью, слитым с цепью TCR, такой как CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ , TCR α или TCR β . Иллюстративные цепи TCR, которые могут быть применены при создании TFP, представлены SEQ ID NO: 944-945, 948, 949-950 и 958 и представлены в WO 2017/070608 A1, которая включена в данный документ посредством ссылки. TFP, содержащий цепь CD3 ϵ , обозначается как TFP CD3 ϵ . TFP, содержащий цепь CD3 γ , называется TFP CD3 γ . TFP, содержащий цепь CD3 δ , обозначается как TFP CD3 δ . TFP, содержащий одновременно цепи CD3 ϵ , CD3 γ или CD3 δ обозначается как TFP CD3 $\epsilon/\gamma/\delta$. Иллюстративные TFP, содержащие различные антигенсвязывающие домены (*например*, фрагменты vL и vH, лиганды, рецепторы *и т.д.*), описанные в данном раскрытии, и коэкспрессирующие вспомогательный модуль, кодирующий NEMO-K277A, представлены в SEQ ID NO: 1900-3123 (**Таблица 13**), SEQ ID NO, антигенсвязывающие домены и антигены-мишени этих TFP могут быть определены путем обращения к **Таблице 12**, поскольку эти конструкции TFP имеют идентичные антигенсвязывающие домены с конструкциями CAR первого поколения, коэкспрессирующими NEMO-K277A, продемонстрированными в **Таблице 12**, и пронумерованы идентичном порядке. Однако вспомогательный модуль, кодирующий NEMO-K277A, не является обязательным. TFP с антигенсвязывающими доменами (*т.е.* фрагментами vL и vH, лигандами и рецепторами *и т.д.*), описанными в данном раскрытии, может быть сконструирован без NEMO-K277A. Таким образом, этот вспомогательный модуль вместе с вышестоящей последовательностью Furine-SGSG-F2A может быть удален из TFP, представленных SEQ ID NO: 1900-3123. Альтернативно, вспомогательный модуль, кодирующий NEMO-K277A, может быть заменен вспомогательными модулями, кодирующими другие сигнальные белки, такие как N hNEMO-K277A-deltaV249-K555, mNEMO-K270A, K13-opt, IKK2-S177E-S181E или IK - S176E-S180E и MyD88 -L265P, FKBPx2-NEMO, NEMO-L600-FKBPx2, CMV-141 *и т.д.*

[00155] Термин «вектор переноса» относится к композиции вещества, которая содержит выделенную нуклеиновую кислоту и которую можно использовать для доставки выделенной нуклеиновой кислоты внутрь клетки. В данной области известны

многочисленные векторы, включая, но не ограничиваясь ими, линейные полинуклеотиды, полинуклеотиды, связанные с ионными или амфифильными соединениями, плазмидами и вирусами. Таким образом, термин «вектор переноса» включает автономно реплицирующуюся плазмиду или вирус. Термин также следует толковать так, чтобы он дополнительно включал неплазмидные и невирусные соединения, которые облегчают перенос нуклеиновой кислоты в клетки, такие как, например, полилизинное соединение, липосома и тому подобное. Примеры векторов переноса вируса включают, но не ограничиваются ими, аденовирусные векторы, адено-ассоциированные вирусные векторы, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы и тому подобное.

[00156] «Трансмембранный домен» (TMD) в контексте данного описания относится к области CAR, которая пересекает плазматическую мембрану. Трансмембранный домен CAR по данному изобретению представляет собой трансмембранную область трансмембранного белка (например, трансмембранные белки типа I), искусственную гидрофобную последовательность или их комбинацию. Другие трансмембранные домены будут очевидны для специалистов в данной области техники и могут использоваться в связи с альтернативными вариантами осуществления данного изобретения. В некоторых вариантах осуществления кодируемый TMD CAR, содержит любую из остовов, описанных в данном документе, содержит трансмембранный домен, выбранный из трансмембранного домена альфа, бета или зета цепи рецептора T-клеток, CD3 γ , CD3 ϵ , CD3 δ , CD28, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD1a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), CD160, CD19, IL2R бета, IL2R гамма, IL7R α , ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDI-Id, ITGAE, CD103, ITGAL, CD-11a, LFA-1, ITGAM, CD-1b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (тактильный), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Lyl08)), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/C β p, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D и/или NKG2C.

[00157] Используемый в данном документе термин «трифункциональный T-клеточный антигенный спариватель или Tri-TAC» относится к платформе CAR следующего поколения, описанной в WO 2015/117229 A1, которая включена в данный документ посредством ссылки. Tri-TAC, нацеленные на разные антигены, могут быть сконструированы с использованием антигенсвязывающих доменов (*например*, фрагментов vL и vH, scFv, vHH, лигандов и рецепторов *и т.д.*), описанных в данном раскрытии, с использованием методов, известных в данной области. Кроме того, различные вспомогательные модули (*например*, NEMO-K277A, mNEMO-K270A *и т.д.*), описанные в данном раскрытии, могут быть экспрессированы в экспрессирующих Tri-TAC иммунных клетках, *например*, T-клетках, *например*, CAR-T-клетках.

[00158] Используемые в данном документе термины «лечить», «лечение»,

«излечивать» или «улучшение» относятся к терапевтическому лечению, в котором цель состоит в том, чтобы обратить, облегчить, улучшить, ингибировать, замедлить или остановить прогрессирование или тяжесть состояния, связанного с, заболеванием или расстройством. Термин «лечение» включает в себя уменьшение или ослабление по меньшей мере, одного неблагоприятного эффекта или симптома состояния, заболевания или расстройства, такого как рак. Лечение обычно «эффективно», если уровни одного или большего количества симптомов или клинических маркеров уменьшены. Альтернативно, лечение является «эффективным», если прогрессирование заболевания уменьшается или останавливается. То есть «лечение» включает в себя не только улучшение симптомов или маркеров, но также прекращение хотя бы замедления прогресса или ухудшения симптомов, которые можно ожидать в отсутствие лечения. Благоприятные или желательные клинические результаты включают, но не ограничиваются ими, ослабление одного или большего количества симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизированное (*m.e.* не ухудшающееся) состояние заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или смягчение состояния болезни и ремиссии (частичной или полной), обнаруживаемой или не обнаруживаемой. Термин «лечение» болезни включает также обеспечение облегчения от симптомов или побочных эффектов заболевания (включая паллиативное лечение). В некоторых вариантах осуществления лечение рака включает уменьшение объема опухоли, уменьшение количества раковых клеток, ингибирование метастазов рака, увеличение продолжительности жизни, уменьшение пролиферации раковых клеток, уменьшение выживаемости раковых клеток или уменьшение различных физиологических симптомов, связанных с раковым состоянием.

[00159] Используемый в данном документе термин «опухоль» относится ко всему росту и пролиферации опухолевых клеток, как злокачественных, так и доброкачественных, а также ко всем предраковым и раковым клеткам и тканям.

[00160] «Вектор», «вектор клонирования» и «вектор экспрессии» в контексте данного описания относятся к носителю, с помощью которого полинуклеотидная последовательность (*например*, чужеродный ген) может быть введена в клетку-хозяина, чтобы трансформировать хозяина и стимулировать экспрессию (*например*, транскрипция и трансляция) введенной последовательности. Векторы включают плазмиды, фаги, вирусы и *т. д.*

[00161] Термин «зета» или, альтернативно, «зета-цепь», «CD3-зета» или «TCR-зета» определяется как белок с номером доступа в GenBank BAG36664.1, или эквивалентные остатки вида отличного от человека, *например* мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и тому подобного, и «зета-стимулирующий домен» или, альтернативно, «CD3-зета-стимулирующий домен» или «TCR-зета-стимулирующий домен» определяется как аминокислотные остатки цитоплазматического домена зета-цепи или их функциональные производные, которые являются достаточными для функциональной передачи исходного сигнала, необходимого для активации Т-клеток. В

одном аспекте цитоплазматический домен зета содержит остатки с 52 по 164 номером доступа в GenBank BAG36664.1 или эквивалентные остатки вида отличного от человека, *например* мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т.п., которые являются их функциональными ортологами. В одном аспекте «зета-стимулирующий домен» или «CD3-зета-стимулирующий домен» представляет собой последовательность, представленную как SEQ ID NO: 4853 (**Таблица 6D**).

[00162] Домен связывания CAR выбран для связывания с желаемым эпитопом. Например, эпитоп, распознаваемый CAR, также можно определить по эпитопу, распознаваемому scFv, содержащемуся в CAR. Например, поскольку антигенспецифический домен CAR CD8SP-MPL-161- (vL-vH) -Myc-BBz-T2A-PAC (SEQ ID NO: 1509 и SEQ ID NO: 5422), нацеленный на MPL, состоит из scFv MPL -161- (vL-vH) (SEQ ID NO: 808 и SEQ ID NO: 4721) ожидается, что CAR будет нацеливаться на тот же эпитоп, что и scFv, и родительское антитело, из которого происходит scFv. Эпитоп, распознаваемый scFv MPL-161- (vL-vH) (SEQ ID NO: 808 и SEQ ID NO: 4721), представлен в SEQ ID NO: 15160. Эпитопы, распознаваемые несколькими scFv и/или их родительскими антителами, используемыми при конструировании CAR и остовы этого раскрытия, известны в данной области. Альтернативно, эпитоп, на который нацелен CAR (включая CAR, которые присутствуют в качестве части остова), можно определить путем генерации ряда мутантов его антигена-мишени и тестирования способности мутантов связываться с CAR-экспрессирующими клетками. В качестве примера, эпитоп, распознаваемый CAR CD8SP-MPL-161- (vL-vH) -Myc-BBz-T2A-PAC, нацеленный на MPL, может быть определен путем создания панели мутантов слитой конструкции MPL-ECD-GGSG-Nluc- AcV5 (ДНК SEQ ID NO: 1015 и БЕЛОК SEQ ID NO: 4928). Мутантные конструкции должны быть трансфицированы в подходящую клеточную линию (*например*, клетки 293FT), а супернатант, содержащий слитый белок, собран и проанализирован на активность Nluc, чтобы гарантировать, что различные мутантные слитые белки MPL-ECD-GGSG-Nluc-AcV5 секретируются в супернатанте. Впоследствии слитые белки будут проверены на их способность связываться с клетками (*например*, клетками Jurkat или Т-клетками), экспрессирующими конструкцию CAR CD8SP-MPL-161- (vL-vH) -Myc-BBz-T2A-PAC. Мутант, который не связывается с CAR-экспрессирующими клетками, является кандидатом на содержание эпитопа, нацеленного на MPL-специфичный CAR. Альтернативный подход к определению эпитопа, распознаваемого конкретным CAR, может включать функциональный конкурентный анализ с различными тестируемыми антителами. Например, Т клетки, экспрессирующие CD8SP-MPL-161- (vL-vH) -Myc-BBz-T2A-PAC CAR, можно совместно культивировать с клеточной линией, экспрессирующей MPL (*например*, клетки HEL), в отсутствие и в присутствии увеличения концентрации различных тестовых антител MPL. В случае, если эпитоп MPL, распознаваемый тестируемым антителом, перекрывается с эпитопом, распознаваемым CD8SP-MPL-161- (vL-vH) -Myc-BBz-T2A-PAC CAR, то ожидается, что тестовое антитело блокирует клетку-мишень уничтожение и продуцирование цитокинов, индуцируемое Т клетками,

экспрессирующими CAR CD8SP-MPL-161- (vL-vH) -Myc-BBz-T2A-PAC дозозависимым образом. Неспецифическое антитело того же изотипа, что и тестируемое антитело, будет включено в качестве контроля и, как ожидается, не окажет влияния на гибель клеток-мишеней и продукцию цитокинов, индуцированную T клетками, экспрессирующими CAR. Подобным образом, специфический CAR может экспрессироваться в клетках Jurkat-NFAT-EGFP, и способность тестируемого антитела блокировать индукцию EGFP индуцирующими CAR клетками Jurkat-NFAT-GFP при совместном культивировании с линией клеток-мишеней может быть использована для определения того, может ли эпитоп, распознаваемый тестируемым антителом, перекрывается с эпитопом, распознаваемым указанным CAR.

[00163] Здесь также представлены композиции, содержащие не встречающийся в природе иммунный рецептор, *например*, CAR, и вспомогательный модуль (включая стимулирующие молекулы NF-κB и селективные активаторы NF-κB) и способ их применения для лечения заболеваний, включая рак. Как описано в данном документе, предоставляются конкретные комбинации обычных CAR (**Таблица 1**) и дополнительных модулей, как описано в **Таблице 2**.

[00164] **Таблица 1:** Обычные архитектуры CAR. Обычные CAR первого поколения (обычные CAR I) имеют домен внутриклеточной сигнализации (ISD) (*например*, CD3z) и не имеют костимуляторного домена. Слитые белки TCR (TFP) являются другим примером обычного CAR I. Обычные CAR второго поколения (обычные CAR 2 или CAR II) имеют один костимуляторный домен (*например*, 41BB или CD28) и домен внутриклеточной сигнализации (ISD) (*например*, CD3z). Обычные CAR третьего поколения (обычные CAR 3 или CAR III) имеют два костимуляторных домена (*например*, 41BB и CD28) и домен внутриклеточной сигнализации (ISD) (*например*, CD3z). Ab-TCR являются двухцепочечными рецепторами и описаны в PCT/US2016/058305. сTCR представляют собой одноцепочечные, полуторацепочечные или двухцепочечные рецепторы, состоящие из антигенсвязывающего домена, полученного из фрагмента vL и vH, которые слиты с одной или несколькими константными цепями TCR и приводят к активации передачи сигналов T клетками. Синтетические иммунные рецепторы являются CAR нового поколения и описаны в US 62/429597 и WO 2018/102795 A1:

Таблица 1 Обычные CAR архитектуры							
1	CAR 1 или CAR I (включая TFP)	ASD	HR	TMD	ISD		
2	CAR 2 (CAR II)	ASD	HR	TMD	CSD	ISD	
3	CAR 3 (CAR III)	ASD	HR	TMD	CSD-I	CSD-II	ISD
4	Ab-TCR	vL-cL	TCRd (1)	2A	Vh-CH1	TCRd (II)	

5	Двухцепочечный сTCR/SIR-1	VI	TCR-C (1)	2A	vH	TCR-C (II)	
6	Полуторацепочечный сTCR/SIR-3		TCR-C (1)	2A	ASD	TCR-C (II)	

[00165] Таблица 2: Иллюстративные остовы

№ остова	CAR	Вспомогательный модуль		
		НАЗВАНИЕ	SEQ ID (ДНК)	SEQ ID (БЕЛОК)
Остов 1	CAR I	K13-vFLIP	972	4885
Остов 2	CAR I	hNEMO-K277A	979	4892
Остов 3	CAR I	FKBPx2-hNEMO-K277A	1006	4919
Остов 4	CAR I	FKBPx2-hNEMO-L753 (251)	1007	4920
Остов 5	CAR I	FKBPx2-hNEMO-L600 (200)	1008	4921
Остов 6	CAR I	FKBPx2-RIP-ID	1009	4922
Остов 7	CAR I	IKK2-S177E-S181E	1002	4915
Остов 8	CAR I	IKK1-S176E-S180E	1004	4917
Остов 9	CAR I	MyD88-L265P	1000	4913
Остов 10	CAR I	TCL-1A	1005	4918
Остов 11	CAR I	IgSP-[hTRAC-opt2]	1010	4923
Остов 12	CAR I	IgSP-[hTRBC-opt2]	1011	4924
Остов 13	CAR II	K13-vFLIP	972	4885
Остов 14	CAR II	hNEMO-K277A	979	4892
Остов 15	CAR II	FKBPx2-hNEMO-K277A	1006	4919
Остов 16	CAR II	FKBPx2-hNEMO-L753 (251)	1007	4920
Остов 17	CAR II	FKBPx2-hNEMO-L600 (200)	1008	4921
Остов 18	CAR II	FKBPx2-RIP-ID	1009	4922
Остов 19	CAR II	IKK2-S177E-S181E	1002	4915
Остов 20	CAR II	IKK1-S176E-S180E	1004	4917
Остов 21	CAR II	MyD88-L265P	1000	4913
Остов 22	CAR II	TCL-1A	1005	4918
Остов 23	CAR II	IgSP-[hTRAC-opt2]	1010	4923
Остов 24	CAR II	IgSP-[hTRBC-opt2]	1011	4924
Остов 25	CAR III	K13-vFLIP	972	4885

ОсТОВ 26	CAR III	hNEMO-K277A	979	4892
ОсТОВ 27	CAR III	FKBPx2-hNEMO-K277A	1006	4919
ОсТОВ 28	CAR III	FKBPx2-hNEMO-L753(251)	1007	4920
ОсТОВ 29	CAR III	FKBPx2-hNEMO-L600(200)	1008	4921
ОсТОВ 30	CAR III	FKBPx2-RIP-ID	1009	4922
ОсТОВ 31	CAR III	IKK2-S177E-S181E	1002	4915
ОсТОВ 32	CAR III	IKK1-S176E-S180E	1004	4917
ОсТОВ 33	CAR III	MYD88-L265P	1000	4913
ОсТОВ 34	CAR III	TCL-1A	1005	4918
ОсТОВ 35	CAR III	IgSP-[hTRAC-opt2]	1010	4923
ОсТОВ 36	CAR III	IgSP-[hTRBC-opt2]	1011	4924
ОсТОВ 37	Ab-TCR	K13-vFLIP	972	4885
ОсТОВ 38	Ab-TCR	hNEMO-K277A	979	4892
ОсТОВ 39	Ab-TCR	FKBPx2-hNEMO-K277A	1006	4919
ОсТОВ 40	Ab-TCR	FKBPx2-hNEMO-L753(251)	1007	4920
ОсТОВ 41	Ab-TCR	FKBPx2-hNEMO-L600(200)	1008	4921
ОсТОВ 42	Ab-TCR	FKBPx2-RIP-ID	1009	4922
ОсТОВ 43	Ab-TCR	IKK2-S177E-S181E (IKK2-SS/EE)	1002	4915
ОсТОВ 44	Ab-TCR	IKK1-S176E-S180E (IKK1-SS/EE)	1004	4917
ОсТОВ 45	Ab-TCR	MYD88-L265P	1000	4913
ОсТОВ 46	Ab-TCR	TCL-1A	1005	4918
ОсТОВ 47	Ab-TCR	IgSP-[hTRAC-opt2]	1010	4923
ОсТОВ 48	Ab-TCR	IgSP-[hTRBC-opt2]	1011	4924
ОсТОВ 49	ДК-cTCR/SIR	K13-vFLIP	972	4885
ОсТОВ 50	ДК-cTCR/SIR	hNEMO-K277A	979	4892
ОсТОВ 51	ДК-cTCR/SIR	FKBPx2-hNEMO-K277A	1006	4919
ОсТОВ 52	ДК-cTCR/SIR	FKBPx2-hNEMO-L753(251)	1007	4920
ОсТОВ 53	ДК-cTCR/SIR	FKBPx2-hNEMO-L600(200)	1008	4921
ОсТОВ 54	ДК-cTCR/SIR	FKBPx2-RIP-ID	1009	4922
ОсТОВ 55	ДК-cTCR/SIR	IKK2-S177E-S181E	1002	4915
ОсТОВ 56	ДК-cTCR/SIR	IKK1-S176E-S180E	1004	4917
ОсТОВ 57	ДК-cTCR/SIR	MYD88-L265P	1000	4913

Остов 58	ДК-сTCR/SIR	TCL-1A	1005	4918
Остов 59	ДК-сTCR/SIR	IgSP-[hTRAC-opt2]	1010	4923
Остов 60	ДК-сTCR/SIR	IgSP-[hTRBC-opt2]	1011	4924
Остов 61	ОНС-сTCR/SIR	K13-vFLIP	972	4885
Остов 62	ОНС-сTCR/SIR	hNEMO-K277A	979	4892
Остов 63	ОНС-сTCR/SIR	FKBPx2-hNEMO-K277A	1006	4919
Остов 64	ОНС-сTCR/SIR	FKBPx2-hNEMO-L753(251)	1007	4920
Остов 65	ОНС-сTCR/SIR	FKBPx2-hNEMO-L600(200)	1008	4921
Остов 66	ОНС-сTCR/SIR	FKBPx2-RIP-ID	1009	4922
Остов 67	ОНС-сTCR/SIR	IKK2-S177E-S181E	1002	4915
Остов 68	ОНС-сTCR/SIR	IKK1-S176E-S180E	1004	4917
Остов 69	ОНС-сTCR/SIR	MYD88-L265P	1000	4913
Остов 70	ОНС-сTCR/SIR	TCL-1A	1005	4918
Остов 71	ОНС-сTCR/SIR	IgSP-[hTRAC-opt2]	1010	4923
Остов 72	ОНС-сTCR/SIR	IgSP-[hTRBC-opt2]	1011	4924

[00166] ТАБЛИЦА 6А: ЦЕЛЕВЫЕ АНТИГЕНЫ, НАЗВАНИЯ И ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ФРАГМЕНТОВ vL И SEQ ID CDR1-3

МИШЕНЬ	НАИМЕНОВАНИЕ vL	SEQ ID vL (ДНК)	SEQ ID vL (БЕЛОК)	SEQ ID-vL CDR1	SEQ ID-vL CDR2	SEQ ID-vL CDR3
ALK	Alk-48-vL	7792	10553	13204	13510	13816
ALK	Alk-58-vL	7793	10554	13205	13511	13817
Амилоид	Amyloid-158-vL	7794	10555	13206	13512	13818
ВСМА	ВСМА-ET-40-vL	7795	10556	13207	13513	13819
ВСМА	ВСМА-ET-54-vL	7796	10557	13208	13514	13820
ВСМА	ВСМА-huC12A3-vL	7797	10558	13209	13515	13821
ВСМА	ВСМА-J6M0-vL	7798	10559	13210	13516	13822
CCR4	CCR4-humAb1567-vL	7799	10560	13211	13517	13823
CD123	CD123-CSL362-vL	7800	10561	13212	13518	13824
CD138	CD138-vL	7801	10562	13213	13519	13825
CD179b	CD179b-vL	7802	10563	13214	13520	13826
CD19	CD19-4G7-vL	7803	10564	13215	13521	13827

CD19	CD19Bu12-vL	7804	10565	13216	13522	13828
CD19	CD19MM-vL	7805	10566	13217	13523	13829
CD19	FMC63-vL	7806	10567	13218	13524	13830
CD19	FMC63-[2]-vL	7807	10568	13219	13525	13831
CD19	FMC63-[3]-vL	7808	10569	13220	13526	13832
CD19	huFMC63-11-vL	7809	10570	13221	13527	13833
CD20	CD20-2F2-vL	7810	10571	13222	13528	13834
CD20	CD20-GA101-vL	7811	10572	13223	13529	13835
CD22	CD22-h10F4-vL	7812	10573	13224	13530	13836
CD22	CD22- H22Rhov2ACDRKA- vL	7813	10574	13225	13531	13837
CD22	CD22m971-vL	7814	10575	13226	13532	13838
CD276	CD276-17-vL	7815	10576	13227	13533	13839
CD30	CD30-5F11-vL	7816	10577	13228	13534	13840
CD30	CD30-Ac10-vL	7817	10578	13229	13535	13841
CD32	CD32-Med9-vL	7818	10579	13230	13536	13842
CD324	CD324-hSC10-17-vL	7819	10580	13231	13537	13843
CD324	CD324-SC10-6-vL	7820	10581	13232	13538	13844
CD33	CD33-huMyc9-vL	7821	10582	13233	13539	13845
CD33	CD33-AF5-vL	7822	10583	13234	13540	13846
CD34	CD34-hu4C7-[2]-vL	7823	10584	13235	13541	13847
CD34	CD34-hu4C7-vL	7824	10585	13236	13542	13848
CD44v6	CD44v6-Biwa8-vL	7825	10586	13237	13543	13849
CD5	CD5-18-vL	7826	10587	13238	13544	13850
CD5	CD5-9-vL	7827	10588	13239	13545	13851
CD70	CD70-h1F6-vL	7828	10589	13240	13546	13852
CD79B	CD79b-2F2-vL	7829	10590	13241	13547	13853
CD79B	huMA79bv28-vL	7830	10591	13242	13548	13854
CDH17	CDH17-PTA001A4- vL	7831	10592	13243	13549	13855
CDH19	CDH19-16A4-vL	7832	10593	13244	13550	13856
CDH6	CDH6-NOV710-vL	7833	10594	13245	13551	13857
CDH6	CDH6-NOV712-vL	7834	10595	13246	13552	13858

CLEC5A	CLEC5A-3E12A2-vL	7835	10596	13247	13553	13859
CLEC5A	CLEC5A-8H8F5-vL	7836	10597	13248	13554	13860
CLL1	CLL1-M26-vL	7837	10598	13249	13555	13861
CLL1	CLL1-M32-vL	7838	10599	13250	13556	13862
CMVpp65/ MHC класс I	CMVpp65-F5-vL	7839	10600	13251	13557	13863
CS1	huLuc63-vL	7840	10601	13252	13558	13864
CS1	HuLuc64-[2]-vL	7841	10602	13253	13559	13865
CS1	HuLuc64-vL	7842	10603	13254	13560	13866
CS1	huLuc90-vL	7843	10604	13255	13561	13867
CSF2RA	CSF2RA-Ab1-vL	7844	10605	13256	13562	13868
CSF2RA	CSF2RA-Ab6-vL	7845	10606	13257	13563	13869
DLL3	DLL3-hSC16-13-vL	7846	10607	13258	13564	13870
DLL3	DLL3-hSC16-56-vL	7847	10608	13259	13565	13871
EBNA3c/M HC класс I	EBNA3c-315-vL	7848	10609	13260	13566	13872
EGFR	Cetuximab-vL	7849	10610	13261	13567	13873
EGFR	Nimotuzumab-vL	7850	10611	13262	13568	13874
EGFRvIII	EGFRviii-139-vL	7851	10612	13263	13569	13875
EGFRvIII	EGFRviii-2173-vL	7852	10613	13264	13570	13876
EpCam1	EpCam1-D5K5-vL	7853	10614	13265	13571	13877
EpCam1	Epcam1-MM1-vL	7854	10615	13266	13572	13878
FITC	FITC-vL	7855	10616	13267	13573	13879
FLT3	FLT3-NC7-vL	7856	10617	13268	13574	13880
HIV-env гликопроте ин	HIV1-N6-vL	7857	10618	13269	13575	13881
Фолатный рецептор 1 (FR1)	FR1-huMov19-vL	7858	10619	13270	13576	13882
GAD	GAD-G3H8-vL	7859	10620	13271	13577	13883
GD2	GD2-hu14-18-vL	7860	10621	13272	13578	13884
GD2	GD2-hu3F8-vL	7861	10622	13273	13579	13885

GD3	GD3-KM-641-vL	7862	10623	13274	13580	13886
GFRa4	GFRa4-P4-10-2-vL	7863	10624	13275	13581	13887
GFRa4	GFRa4-P4-10-vL	7864	10625	13276	13582	13888
GFRa4	GFRAlpha4-P4-6-vL	7865	10626	13277	13583	13889
GM1	GM1-5B2-vL	7866	10627	13278	13584	13890
GM1	GM1-7E5-vL	7867	10628	13279	13585	13891
GP100/МН С класс I	gp100-G2D12-vL	7868	10629	13280	13586	13892
GP100/МН С класс I	gp100-vL	7869	10630	13281	13587	13893
GPC3	GPC3-4E5-vL	7870	10631	13282	13588	13894
GNMB	gpNMB-115-vL	7871	10632	13283	13589	13895
GPRC5D	GPRC5D-ET150-18- vL	7872	10633	13284	13590	13896
GPRC5D	GPRC5D-ET150-5- vL	7873	10634	13285	13591	13897
Her2	Her2-Hu4D5-vL	7874	10635	13286	13592	13898
HIV-1 (77- 85)/МНС	HIV1-E5-vL	7875	10636	13287	13593	13899
HIV-env гликопроте ин	HIV1-3BNC117-vL	7876	10637	13288	13594	13900
HIV-env гликопроте ин	HIV1-PGT-128-vL	7877	10638	13289	13595	13901
HIV-env гликопроте ин	HIV1-VR-C01-vL	7878	10639	13290	13596	13902
HIV-env гликопроте ин	HIV1-X5-vL	7879	10640	13291	13597	13903
HMW- МАО	HMW-MAA-hIND- vL	7880	10641	13292	13598	13904

HTLV1- TAX/MHC класс I	TAX-T3E3-vL	7881	10642	13293	13599	13905
HTLV1- TAX/MHC класс I	TAX-T3F2-vL	7882	10643	13294	13600	13906
IL11Ra	IL11Ra-8E2-vL	7883	10644	13295	13601	13907
IL13Ra2	IL13Ra2-hu107-vL	7884	10645	13296	13602	13908
IL13Ra2	IL13Ra2-Hu108-vL	7885	10646	13297	13603	13909
IL6R	IL6R-M83-vL	7886	10647	13298	13604	13910
Грипп А НА	FLU-MEDI-8852-vL	7887	10648	13299	13605	13911
KSHV-Gh	YC15-vL	7888	10649	13300	13606	13912
KSHV- K8.1	4C3-vL	7889	10650	13301	13607	13913
L1CAM	L1CAM-9-3-HU3-vL	7890	10651	13302	13608	13914
LAMP1	LAMP1-humab1-2-vL	7891	10652	13303	13609	13915
LAMP1	LAMP1-Mb4-vL	7892	10653	13304	13610	13916
LewisY	LewisY-huS193-vL	7893	10654	13305	13611	13917
Lym1	Lym1-vL	7894	10655	13306	13612	13918
Lym2	Lym2-vL	7895	10656	13307	13613	13919
MART1/M HC класс I	MART1-CAG10-vL	7896	10657	13308	13614	13920
MART1/M HC класс I	MART1-CLA12-vL	7897	10658	13309	13615	13921
Мезотелин	Mesothelin-m912-vL	7898	10659	13310	13616	13922

MPL (TPO-R)	MPL-111-vL	7899	10660	13311	13617	13923
MPL (TPO-R)	MPL-161-HL-vL	7900	10661	13312	13618	13924
MPL (TPO-R)	MPL-161-vL	7901	10662	13313	13619	13925
MPL (TPO-R)	MPL-175-vL	7902	10663	13314	13620	13926
MPL (TPO-R)	MPL-178-vL	7903	10664	13315	13621	13927
MPL (TPO-R)	MPL-huVB22Bw5-vL	7904	10665	13316	13622	13928
MPL (TPO-R)	MPL-12E10-vL	7905	10666	13317	13623	13929
MPL (TPO-R)	MPL-AB317-vL	7906	10667	13318	13624	13930
Muc1/MHC класс I	MUC1-D6-M3A1-vL	7907	10668	13319	13625	13931
Muc1/MHC класс I	Muc1-D6-M3B8-vL	7908	10669	13320	13626	13932
Muc16	Muc16-4H11-vL	7909	10670	13321	13627	13933
NKG2D	NKG2D-MS-vL	7910	10671	13322	13628	13934
NYBR1	NYBR1-vL	7911	10672	13323	13629	13935
NY-ESO/MHC класс I	NY-ESO-T1-vL	7912	10673	13324	13630	13936
PD1	PD1-4H1-vL	7913	10674	13325	13631	13937

PD1	PD1-5C4-vL	7914	10675	13326	13632	13938
PDL1	PDL1-10A5-vL	7915	10676	13327	13633	13939
PDL1	PDL1-Atezoli-vL	7916	10677	13328	13634	13940
PDL1	PDL1-SP142-vL	7917	10678	13329	13635	13941
PR1/MHC класс I	PR1-vL	7918	10679	13330	13636	13942
PSCA	PSCA-Ha14-117-vL	7919	10680	13331	13637	13943
PSCA	PSCA-Ha14-121-vL	7920	10681	13332	13638	13944
PSMA	PSMA-006-vL	7921	10682	13333	13639	13945
PSMA	PSMA-J591-vL	7922	10683	13334	13640	13946
PTK7	PTK7-hSC6-23-vL	7923	10684	13335	13641	13947
PTK7	PTK7-SC6-10-2-vL	7924	10685	13336	13642	13948
ROR1	ROR1-4A5-vL	7925	10686	13337	13643	13949
ROR1	ROR1-4C10-vL	7926	10687	13338	13644	13950
SLea	SLea-5B1-vL	7927	10688	13339	13645	13951
SLea	SLea-7E3-vL	7928	10689	13340	13646	13952
SSEA4	SSEA4-vL	7929	10690	13341	13647	13953
TCRb1	TCRB1-E09-vL	7930	10691	13342	13648	13954
TCRb1	TCRB1-Jovi1-vL	7931	10692	13343	13649	13955
TCRb2	TCRB2-CP01-D05- vL	7932	10693	13344	13650	13956
TCRb2	TCRB2-CP01-E05-vL	7933	10694	13345	13651	13957
TCRgd	TCRgd-G5-4-vL	7934	10695	13346	13652	13958
TERT/MH С класс I	TERT-3G3-T865-vL	7935	10696	13347	13653	13959
TERT/MH С класс I	TERT-4A9-T540-vL	7936	10697	13348	13654	13960
TGFBR2	TGFBR2-Ab1-vL	7937	10698	13349	13655	13961
TIM1	TIM1-HVCR1-270-2- vL	7938	10699	13350	13656	13962
TIM1	Tim1HVCR1-ARD5- vL	7939	10700	13351	13657	13963
TnAg	TnAg-vL	7940	10701	13352	13658	13964

Tn-MUC1	Tn-Muc1-hu5E5-vL	7941	10702	13353	13659	13965
TROP2	TROP2-ARA47-HV3KV3-vL	7942	10703	13354	13660	13966
TROP2	TROP2-h7E6-SVG-vL	7943	10704	13355	13661	13967
TSHR	TSHR-5C9-vL	7944	10705	13356	13662	13968
TSHR	TSHR-K1-70-vL	7945	10706	13357	13663	13969
TSHR	TSHR-KB1-vL	7946	10707	13358	13664	13970
TSLRP	TSLRP-vL	7947	10708	13359	13665	13971
Тирозиназа /МНС класс I	Tyro-B2-vL	7948	10709	13360	13666	13972
Тирозиназа /МНС класс I	Tyro-Mc1-vL	7949	10710	13361	13667	13973
Тирозиназа /МНС класс I	TA2-vL	7950	10711	13362	13668	13974
VEGFR3	VEGFR3-Ab1-vL	7951	10712	13363	13669	13975
WT1/МНС класс I	WT1-Ab13-vL	7952	10713	13364	13670	13976
WT1/МНС класс I	WT1-Ab15-vL	7953	10714	13365	13671	13977
WT1/МНС класс I	WT1-Ab1-vL	7954	10715	13366	13672	13978
WT1/МНС класс I	WT1-Ab5-vL	7955	10716	13367	13673	13979
EBV-gp350	EBV-gp350-vL	7956	10717	13368	13674	13980
CD123	CD123-1172-vL	7957	10718	13369	13675	13981
CDH19	CDH19-4B10-vL	7958	10719	13370	13676	13982
Бета- рецептор фолата	FRbeta-m923-vL	7959	10720	13371	13677	13983
LHR	LHR-8B7-vL	7960	10721	13372	13678	13984

LHR	LHR-5F4-21-vL	7961	10722	13373	13679	13985
B7H4	B7H4-hu22C10-vL	7962	10723	13374	13680	13986
B7H4	B7H4-hu1D11-vL	7963	10724	13375	13681	13987
IgE	IgE-omalizumab-vL	7964	10725	13376	13682	13988
CD23	CD23-p5E8-vL	7965	10726	13377	13683	13989
GCC	GCC-5F9-vL	7966	10727	13378	13684	13990
GCC	GCC-Ab229-vL	7967	10728	13379	13685	13991
CD200R	CD200R-huDx182-vL	7968	10729	13380	13686	13992
AFP/MHC класс I	AFP-61-vL	7969	10730	13381	13687	13993
AFP/MHC класс I	AFP-76-vL	7970	10731	13382	13688	13994
AFP/MHC класс I	AFP-79-vL	7971	10732	13383	13689	13995
BCMA	BCMA-ET-03-vL	7972	10733	13384	13690	13996
BCMA	BCMA- huC11.D5.3L1H3-vL	7973	10734	13385	13691	13997
BCMA	BCMA-huC13-F12- vL	7974	10735	13386	13692	13998
CD123	CD123-DART-1-vL	7975	10736	13387	13693	13999
CD123	CD123-DART-2-vL	7976	10737	13388	13694	14 000
CD123	CD123-I3RB18-vL	7977	10738	13389	13695	14001
CD123	CD123-hu3E3-vL	7978	10739	13390	13696	14002
CD123	CD123-9F6-vL	7979	10740	13391	13697	14003
CD123	CD123-I3RB2-vL	7980	10741	13392	13698	14004
CD123	CD123-1176-vL	7981	10742	13393	13699	14005
CD123	CD123-8B11-vL	7982	10743	13394	13700	14006
CD123	CD123-2B8-vL	7983	10744	13395	13701	14007
CD123	CD123-9D7-vL	7984	10745	13396	13702	14008
CD123	CD123-3B10-vL	7985	10746	13397	13703	14009
CD19	CD19-MEDI-3649-vL	7986	10747	13398	13704	14010
CD19	CD19-Medrex-24D1- vL	7987	10748	13399	13705	14011

CD19	CD19-MOR0028-vL	7988	10749	13400	13706	14012
CD19	CD19-HD37-H2L1-vL	7989	10750	13401	13707	14013
CD19	CD19-huBly3-vL	7990	10751	13402	13708	14014
CD19	CD19-huSJ25C1-vL	7991	10752	13403	13709	14015
CD19	CD19-hB4-vL	7992	10753	13404	13710	14016
CD19	CD19-hu-mROO5-1-vL	7993	10754	13405	13711	14017
CD19	CD19-hA19-vL	7994	10755	13406	13712	14018
CD20	CD20-Leu16-vL	7995	10756	13407	13713	14019
CD20	CD20-11B8-vL	7996	10757	13408	13714	14020
CD20	CD20-2C6-vL	7997	10758	13409	13715	14021
CD20	CD20-2H7-vL	7998	10759	13410	13716	14022
CD20	CD20-hA20-vL	7999	10760	13411	13717	14023
CD20	CD20-BM-CA-1925-v4-vL	8000	10761	13412	13718	14024
CD20	CD20-Ubli-v4-vL	8001	10762	13413	13719	14025
CD20	CD20-h1F5-vL	8002	10763	13414	13720	14026
CD20	CD20-7D8-vL	8003	10764	13415	13721	14027
CD20	CD20-AME-33-vL	8004	10765	13416	13722	14028
CD33	CD33-Boehr2800308-vL	8005	10766	13417	13723	14029
CD33	CD33-Him3-4-vL	8006	10767	13418	13724	14030
CD33	CD33-SGNh2H12-vL	8007	10768	13419	13725	14031
CD33	CD33-15G15-33-vL	8008	10769	13420	13726	14032
CD33	CD33-33H4-vL	8009	10770	13421	13727	14033
CD33	CD33-9C3-2-vL	8010	10771	13422	13728	14034
CD99	CD99-hu12E7-vL	8011	10772	13423	13729	14035
CLL1	CLL1-21C9-L2H3-vL	8012	10773	13424	13730	14036
CLL1	CLL1-6E7L4H1e-vL	8013	10774	13425	13731	14037
CLL1	CLL1-hu1075-v1-vL	8014	10775	13426	13732	14038
CLL1	CLL1-hu1075-v2-vL	8015	10776	13427	13733	14039
CS1	CS1-PDL241-vL	8016	10777	13428	13734	14040
CS1	CS1-Hu27A-vL	8017	10778	13429	13735	14041

CS1	CS1-ScHu34C3-vL	8018	10779	13430	13736	14042
CS1	CS1-Hu31-D2-vL	8019	10780	13431	13737	14043
CS1	CS1-Luc34-vL	8020	10781	13432	13738	14044
CS1	CS1-LucX2-vL	8021	10782	13433	13739	14045
FITC	FITC-4M-53-vL	8022	10783	13434	13740	14046
FITC	FITC-E2-vL	8023	10784	13435	13741	14047
GPRC5D	GPRC5D-ET150-1-vL	8024	10785	13436	13742	14048
GPRC5D	GPRC5D-ET150-2-vL	8025	10786	13437	13743	14049
HLA-A2	HLA-A2-3PB2-vL	8026	10787	13438	13744	14050
HPV16-E7/MHC класс I	HPV16-7-8-vL	8027	10788	13439	13745	14051
HPV16-E7/MHC класс I	HPV16-2-vL	8028	10789	13440	13746	14052
Тканевой фактор 1 (TF1)	TF1-98-vL	8029	10790	13441	13747	14053
Tn-MUC1	Tn-Muc1-5E5-vL	8030	10791	13442	13748	14054
Ig каппа, легкая цепь	Каппа-LC1-vL	8031	10792	13443	13749	14055
PTK7	PTK7-7C8-vL	8032	10793	13444	13750	14056
PTK7	PTK7-12C6a-vL	8033	10794	13445	13751	14057
CD19	hCD19-EUK5-13-vL	8034	10795	13446	13752	14058
Ras/MHC класс I	Ras-Ab2-vL	8035	10796	13447	13753	14059
Ras/MHC класс I	Ras-Ab4-vL	8036	10797	13448	13754	14060
CLD18A2	CLD18A2-43A11-vL	8037	10798	13449	13755	14061

CLD18A2	CLD18A2-175D10-vL	8038	10799	13450	13756	14062
CD43	CD43-huJL-1-257-10-vL	8039	10800	13451	13757	14063
CD69L	CD69L-DREG200-vL	8040	10801	13452	13758	14064
NY-ESO	NYESO-35-15-vL	8041	10802	13453	13759	14065
P-гликопротеин (MDR1)	Pgp-9F11-vL	8042	10803	13454	13760	14066
Стрептэг	Streptag-vL	8043	10804	13455	13761	14067
BCMA	BCMA-huC13-F12-L1H2-vL	8044	10805	13456	13762	14068
BCMA	BCMA-huC12A3-L3H3-vL	8045	10806	13457	13763	14069
MPL/ТРО-R,	Hu-161-2-vL	8046	10807	13458	13764	14070
P-гликопротеин (MDR1)	Pgp-MRK16-vL	8047	10808	13459	13765	14071
CD22	CD22-5-vL	8048	10809	13460	13766	14072
CD22	CD22-10-vL	8049	10810	13461	13767	14073
CD22	CD22-31-vL	8050	10811	13462	13768	14074
CD22	CD22-53-vL	8051	10812	13463	13769	14075
CD22	CD22-65-vL	8052	10813	13464	13770	14076
CD19	hu-FMC65-1-vL	8053	10814	13465	13771	14077
MPL/ТРО-R	MPL-hu-175-2-vL	8054	10815	13466	13772	14078
MPL/ТРО-R	MPL-hu-111-2-vL	8055	10816	13467	13773	14079
CD179a	CD179a-2460-B04-vL	8056	10817	13468	13774	14080
CD179a	CD179a-2462-E07-vL	8057	10818	13469	13775	14081
CD37	CD37-TRU-HL-vL	8058	10819	13470	13776	14082
CD37	huCD37-Boeh-vL	8059	10820	13471	13777	14083

CD70	CD70-13D-vL	8060	10821	13472	13778	14084
CD70	CD70-16D-vL	8061	10822	13473	13779	14085
CD70	CD70-21D-vL	8062	10823	13474	13780	14086
CD70	CD70-1G2D-vL	8063	10824	13475	13781	14087
CD70	CD70-hu2H5-vL	8064	10825	13476	13782	14088
CD70	CD70-69A7-vL	8065	10826	13477	13783	14089
CD70	CD70-10B4-vL	8066	10827	13478	13784	14090
CD70	CD70-24D-vL	8067	10828	13479	13785	14091
CD70	CD70-25D-vL	8068	10829	13480	13786	14092
HIV-env гликопроте ин	HIV1-N49P6-vL	8069	10830	13481	13787	14093
HIV-env гликопроте ин	HIV1-N49P7-vL	8070	10831	13482	13788	14094
HIV-env гликопроте ин	HIV1-N49P11-vL	8071	10832	13483	13789	14095
HIV-env гликопроте ин	HIV1-N60P1-1	8072	10833	13484	13790	14096
HIV-env гликопроте ин	HIV1-N60P25-vL	8073	10834	13485	13791	14097
HIV-env гликопроте ин	HIV1-N49P9-vL	8074	10835	13486	13792	14098
HIV-env гликопроте ин	HIV1-N60P2-1-vL	8075	10836	13487	13793	14099
HIV-env гликопроте ин	HIV1-N60P31-1-vL	8076	10837	13488	13794	14100
HIV-env	HIV1-N60P22-vL	8077	10838	13489	13795	14101

гликопротеин						
HIV-env гликопротеин	HIV1-N60P38-vL	8078	10839	13490	13796	14102
HIV-env гликопротеин	HIV1-N60P30-vL	8079	10840	13491	13797	14103
HIV-env гликопротеин	HIV1-N60P36-vL	8080	10841	13492	13798	14104
HIV-env гликопротеин	HIV1-N60P39-vL	8081	10842	13493	13799	14105
HIV-env гликопротеин	HIV1-N6039-1-vL	8082	10843	13494	13800	14106
HIV-env гликопротеин	HIV1-N60P47-vL	8083	10844	13495	13801	14107
HIV-env гликопротеин	HIV1-N60P48-vL	8084	10845	13496	13802	14108
HIV-env гликопротеин	HIV1-N60P51-vL	8085	10846	13497	13803	14109
HIV-env гликопротеин	HIV1-N60P35-vL	8086	10847	13498	13804	14110
HIV-env гликопротеин	HIV1-N60P37-vL	8087	10848	13499	13805	14111
Lym1	Hu-Lym1-vL	8088	10849	13500	13806	14112
Lym2	Hu-Lym2-vL	8089	10850	13501	13807	14113

BCMA	BCMA-USC1-vL	8090	10851	13502	13808	14114
BCMA	BCMA-USC2-vL	8091	10852	13503	13809	14115
BCMA	BCMA-USC3-vL	8092	10853	13504	13810	14116
BCMA	BCMA-USC4-vL	8093	10854	13505	13811	14117
BCMA	BCMA-USC5-vL	8094	10855	13506	13812	14118
BCMA	BCMA-USC6-vL	8095	10856	13507	13813	14119
BCMA	BCMA-USC7-vL	8096	10857	13508	13814	14120
CD43	CD43-huJL-1-257-10-vL	8097	10858	13509	13815	14121

[00167] ТАБЛИЦА 6В: ЦЕЛЕВЫЕ АНТИГЕНЫ, НАЗВАНИЯ И SEQ ID VH ФРАГМЕНТОВ И SEQ ID CDR1-3

МИШЕНЬ	НАИМЕНОВАНИЕ vH	SEQ ID vH (ДНК)	SEQ ID vH (БЕЛОК)	SEQ ID-vH CDR1	SEQ ID-vH CDR2	SEQ ID-vH CDR3
ALK	Alk-48-vH	8098	10859	14122	14428	14734
ALK	Alk-58-vH	8099	10860	14123	14429	14735
Амилоид	Amyloid-158-vH	8100	10861	14124	14430	14736
BCMA	BCMA-ET-40-vH	8101	10862	14125	14431	14737
BCMA	BCMA-ET-54-vH	8102	10863	14126	14432	14738
BCMA	BCMA-huC12A3-vH	8103	10864	14127	14433	14739
BCMA	BCMA-J6M0-vH	8104	10865	14128	14434	14740
CCR4	CCR4-humAb1567-vH	8105	10866	14129	14435	14741
CD123	CD123-CSL362-vH	8106	10867	14130	14436	14742
CD138	CD138-vH	8107	10868	14131	14437	14743
CD179b	CD179b-vH	8108	10869	14132	14438	14744
CD19	CD19-4G7-vH	8109	10870	14133	14439	14745
CD19	CD19Bu12-vH	8110	10871	14134	14440	14746
CD19	CD19Bu12-[2]-vH	8111	10872	14135	14441	14747
CD19	CD19MM-vH	8112	10873	14136	14442	14748
CD19	FMC63-vH	8113	10874	14137	14443	14749

CD19	FMC-63-vH	8114	10875	14138	14444	14750
CD19	huFMC63-11-vH	8115	10876	14139	14445	14751
CD20	CD20-2F2-vH	8116	10877	14140	14446	14752
CD20	CD20-GA101-vH	8117	10878	14141	14447	14753
CD22	CD22-h10F4-vH	8118	10879	14142	14448	14754
CD22	CD22- H22Rhov2ACDR KA-vH	8119	10880	14143	14449	14755
CD22	CD22m971-vH	8120	10881	14144	14450	14756
CD276	CD276-17-vH	8121	10882	14145	14451	14757
CD30	CD30-5F11-vH	8122	10883	14146	14452	14758
CD30	CD30-Ac10-vH	8123	10884	14147	14453	14759
CD32	CD32-Med9-vH	8124	10885	14148	14454	14760
CD324	CD324-hSC10-17- vH	8125	10886	14149	14455	14761
CD324	CD324-SC10-6- vH	8126	10887	14150	14456	14762
CD33	CD33-huMyc9-vH	8127	10888	14151	14457	14763
CD33	CD33-AF5-vH	8128	10889	14152	14458	14764
CD34	CD34-hu4C7-vH	8129	10890	14153	14459	14765
CD44v6	CD44v6-Biwa8- vH	8130	10891	14154	14460	14766
CD5	CD5-18-vH	8131	10892	14155	14461	14767
CD5	CD5-9-vH	8132	10893	14156	14462	14768
CD70	CD70-h1F6-vH	8133	10894	14157	14463	14769
CD79b	CD79b-2F2-vH	8134	10895	14158	14464	14770
CD79b	huMA79bv28-vH	8135	10896	14159	14465	14771
CDH17	CDH17- PTA001A4-vH	8136	10897	14160	14466	14772
CDH19	CDH19-16A4-vH	8137	10898	14161	14467	14773
CDH6	CDH6-NOV710- vH	8138	10899	14162	14468	14774
CDH6	CDH6-NOV712- vH	8139	10900	14163	14469	14775

CLEC5A	CLEC5A-3E12A2-vH	8140	10901	14164	14470	14776
CLEC5A	CLEC5A-8H8F5-vH	8141	10902	14165	14471	14777
CLL1	CLL1-M26-vH	8142	10903	14166	14472	14778
CLL1	CLL1-M32-vH	8143	10904	14167	14473	14779
CMVpp65/MHC класс I	CMVpp65-F5-vH	8144	10905	14168	14474	14780
CS1	huLuc63-vH	8145	10906	14169	14475	14781
CS1	HuLuc64-vH	8146	10907	14170	14476	14782
CS1	huLuc90-vH	8147	10908	14171	14477	14783
CSF2RA	CSF2RA-Ab1-vH	8148	10909	14172	14478	14784
CSF2RA	CSF2RA-Ab6-vH	8149	10910	14173	14479	14785
DLL3	DLL3-hSC16-13-vH	8150	10911	14174	14480	14786
DLL3	DLL3-hSC16-56-vH	8151	10912	14175	14481	14787
EBNA3c/MHC класс I	EBNA3c-315-vH	8152	10913	14176	14482	14788
EGFR	Cetuximab-vH	8153	10914	14177	14483	14789
EGFR	Nimotuzumab-vH	8154	10915	14178	14484	14790
EGFRviii	EGFRviii-139-vH	8155	10916	14179	14485	14791
EGFRviii	EGFRviii-2173-vH	8156	10917	14180	14486	14792
EpCam1	EpCam1-D5K5-vH	8157	10918	14181	14487	14793
EpCam1	Epcam1-MM1-vH	8158	10919	14182	14488	14794
FITC	FITC-vH	8159	10920	14183	14489	14795
FLT3	FLT3-NC7-vH	8160	10921	14184	14490	14796
HIV-env гликопротеин	HIV1-N6-vH	8161	10922	14185	14491	14797
Фолатный рецептор 1 (FR1)	FR1-huMov19-vH	8162	10923	14186	14492	14798
GAD	GAD-G3H8-vH	8163	10924	14187	14493	14799

GD2	GD2-hu14-18-vH	8164	10925	14188	14494	14800
GD2	GD2-hu3F8-vH	8165	10926	14189	14495	14801
GD3	GD3-KM-641-vH	8166	10927	14190	14496	14802
GFRa4	GFRa4-P4-10-vH	8167	10928	14191	14497	14803
GFRa4	GFRAlpha4-P4-6-vH	8168	10929	14192	14498	14804
GM1	GM1-5B2-vH	8169	10930	14193	14499	14805
GM1	GM1-7E5-vH	8170	10931	14194	14500	14806
GP100/MHC класс I	gp100-G2D12-vH	8171	10932	14195	14501	14807
GP100/MHC класс I	gp100-vH	8172	10933	14196	14502	14808
GPC3	GPC3-4E5-vH	8173	10934	14197	14503	14809
gpNMB	gpNMB-115-vH	8174	10935	14198	14504	14810
GPRC5D	GPRC5D-ET150-18-vH	8175	10936	14199	14505	14811
GPRC5D	GPRC5D-ET150-5-vH	8176	10937	14200	14506	14812
Her2	Her2-Hu4D5-vH	8177	10938	14201	14507	14813
HIV-1 (77-85)/MHC	HIV1-E5-vH	8178	10939	14202	14508	14814
HIV-env гликопротеин	HIV1-3BNC117-vH	8179	10940	14203	14509	14815
HIV-env гликопротеин	HIV1-PGT-128-vH	8180	10941	14204	14510	14816
HIV-env гликопротеин	HIV1-VR-C01-vH	8181	10942	14205	14511	14817
HIV-env гликопротеин	HIV1-X5-vH	8182	10943	14206	14512	14818
HMW-MAA	HMW-MAA-hIND-vH	8183	10944	14207	14513	14819
HTLV1-	TAX-T3E3-vH	8184	10945	14208	14514	14820

TAX/МНС класс I						
HTLV1- TAX/МНС класс I	TAX-T3F2-vH	8185	10946	14209	14515	14821
IL11Ra	IL11Ra-8E2-vH	8186	10947	14210	14516	14822
IL13Ra2	IL13Ra2-hu107- vH	8187	10948	14211	14517	14823
IL13Ra2	IL13Ra2-Hu108- vH	8188	10949	14212	14518	14824
IL6R	IL6R-M83-vH	8189	10950	14213	14519	14825
Грипп А НА	FLU-MEDI-8852- vH	8190	10951	14214	14520	14826
KSHV-gH	YC15-vH	8191	10952	14215	14521	14827
KSHV-K8.1	4C3-vH	8192	10953	14216	14522	14828
L1CAM	L1CAM-9-3- HU3-vH	8193	10954	14217	14523	14829
LAMP1	LAMP1-humab1- 2-vH	8194	10955	14218	14524	14830
LAMP1	LAMP1-Mb4-vH	8195	10956	14219	14525	14831
LewisY	LewisY-huS193- vH	8196	10957	14220	14526	14832
Lym1	Lym1-vH	8197	10958	14221	14527	14833
Lym2	Lym2-vH	8198	10959	14222	14528	14834
MART1/МНС класс I	MART1-CAG10- vH	8199	10960	14223	14529	14835
MART1/МНС класс I	MART1-CLA12- vH	8200	10961	14224	14530	14836
Мезотелин	Mesothelin-m912- [2]-vH	8201	10962	14225	14531	14837
Мезотелин	Mesothelin-m912- vH	8202	10963	14226	14532	14838

MPL (TPO-R)	MPL-111-vH	8203	10964	14227	14533	14839
MPL (TPO-R)	MPL-161-HL-vH	8204	10965	14228	14534	14840
MPL (TPO-R)	MPL-161-vH	8205	10966	14229	14535	14841
MPL (TPO-R)	MPL-175-vH	8206	10967	14230	14536	14842
MPL (TPO-R)	MPL-178-vH	8207	10968	14231	14537	14843
MPL (TPO-R)	MPL- huVB22Bw5-vH	8208	10969	14232	14538	14844
MPL (TPO-R)	MPL-12E10-vH	8209	10970	14233	14539	14845
MPL (TPO-R)	MPL-AB317-vH	8210	10971	14234	14540	14846
Muc1/MHC класс I	MUC1-D6-M3A1- vH	8211	10972	14235	14541	14847
Muc1/MHC класс I	Muc1-D6-M3B8- vH	8212	10973	14236	14542	14848
Muc16	Muc16-4H11-vH	8213	10974	14237	14543	14849
NKG2D	NKG2D-MS-vH	8214	10975	14238	14544	14850
NYBR1	NYBR1-vH	8215	10976	14239	14545	14851
NY-ESO/MHC класс I	NY-ESO-T1-vH	8216	10977	14240	14546	14852
NY-ESO/MHC класс I	NY-ESO-T2-vH	8217	10978	14241	14547	14853
PD1	PD1-4H1-vH	8218	10979	14242	14548	14854
PD1	PD1-5C4-vH	8219	10980	14243	14549	14855
PDL1	PDL1-Atezoli-vH	8220	10981	14244	14550	14856
PDL1	PDL1-SP142-vH	8221	10982	14245	14551	14857
PR1/MHC класс I	PR1-vH	8222	10983	14246	14552	14858
PSCA	PSCA-Ha14-117- vH	8223	10984	14247	14553	14859
PSCA	PSCA-Ha14-121- vH	8224	10985	14248	14554	14860
PSMA	PSMA-006-vH	8225	10986	14249	14555	14861

PSMA	PSMA-J591-vH	8226	10987	14250	14556	14862
PTK7	PTK7-hSC6-23-vH	8227	10988	14251	14557	14863
PTK7	PTK7-SC6-10-2-vH	8228	10989	14252	14558	14864
ROR1	ROR1-4A5-vH	8229	10990	14253	14559	14865
ROR1	ROR1-4C10-vH	8230	10991	14254	14560	14866
SLea	SLea-5B1-vH	8231	10992	14255	14561	14867
SLea	SLea-7E3-vH	8232	10993	14256	14562	14868
SSEA4	SSEA4-vH	8233	10994	14257	14563	14869
TCRB1	TCRB1-E09-vH	8234	10995	14258	14564	14870
TCRB1	TCRB1-Jovi1-vH	8235	10996	14259	14565	14871
TCRB2	TCRB2-CP01-D05-vH	8236	10997	14260	14566	14872
TCRB2	TCRB2-CP01-E05-vH	8237	10998	14261	14567	14873
TCRgd	TCRgd-G5-4-vH	8238	10999	14262	14568	14874
TERT/MHC класс I	TERT-3G3-T865-vH	8239	11 000	14263	14569	14875
TERT/MHC класс I	TERT-4A9-T540-vH	8240	11001	14264	14570	14876
TGFBR2	TGFBR2-Ab1-vH	8241	11002	14265	14571	14877
TIM1	TIM1-HVCR1-270-2-vH	8242	11003	14266	14572	14878
TIM1	Tim1HVCR1-ARD5-vH	8243	11004	14267	14573	14879
TnAg	TnAg-vH	8244	11005	14268	14574	14880
Tn-MUC1	Tn-Muc1-hu5E5-vH	8245	11006	14269	14575	14881
TROP2	TROP2-ARA47-HV3KV3-vH	8246	11007	14270	14576	14882
TROP2	TROP2-h7E6-SVG-vH	8247	11008	14271	14577	14883
TSHR	TSHR-5C9-vH	8248	11009	14272	14578	14884

TSHR	TSHR-K1-70-vH	8249	11010	14273	14579	14885
TSHR	TSHR-KB1-vH	8250	11011	14274	14580	14886
TSLRP	TSLRP-vH	8251	11012	14275	14581	14887
Тирозиназа/МН С класс I	Tyro-B2-vH	8252	11013	14276	14582	14888
Тирозиназа/МН С класс I	Tyro-Mc1-vH	8253	11014	14277	14583	14889
Тирозиназа/МН С класс I	TA2-vH	8254	11015	14278	14584	14890
VEGFR3	VEGFR3-Ab1-vH	8255	11016	14279	14585	14891
WT1/МНС класс I	WT1-Ab13-vH	8256	11017	14280	14586	14892
WT1/МНС класс I	WT1-Ab15-vH	8257	11018	14281	14587	14893
WT1/МНС класс I	WT1-Ab1-vH	8258	11019	14282	14588	14894
WT1/МНС класс I	WT1-Ab5-[2]-vH	8259	11020	14283	14589	14895
WT1/МНС класс I	WT1-Ab5-vH	8260	11021	14284	14590	14896
EBV-gp350	EBV-gp350-vH	8261	11022	14285	14591	14897
CD123	CD123-1172-vH	8262	11023	14286	14592	14898
CDH19	CDH19-4B10-vH	8263	11024	14287	14593	14899
Бета-рецептор фолата	FRbeta-m923-vH	8264	11025	14288	14594	14900
LHR	LHR-8B7-vH	8265	11026	14289	14595	14901
LHR	LHR-5F4-21-vH	8266	11027	14290	14596	14902
B7H4	B7H4-hu22C10- vH	8267	11028	14291	14597	14903
B7H4	B7H4-hu1D11-vH	8268	11029	14292	14598	14904
IgE	IgE-omalizumab- vH	8269	11030	14293	14599	14905
CD23	CD23-p5E8-vH	8270	11031	14294	14600	14906
GCC	GCC-5F9-vH	8271	11032	14295	14601	14907

GCC	GCC-Ab229-vH	8272	11033	14296	14602	14908
CD200R	CD200R- huDx182-vH	8273	11034	14297	14603	14909
AFP/МНС класс I	AFP-61-vH	8274	11035	14298	14604	14910
AFP/МНС класс I	AFP-76-vH	8275	11036	14299	14605	14911
AFP/МНС класс I	AFP-79-vH	8276	11037	14300	14606	14912
BCMA	BCMA-ET-03-vH	8277	11038	14301	14607	14913
BCMA	BCMA- huC11.D5.3L1H3- vH	8278	11039	14302	14608	14914
BCMA	BCMA-huC13- F12-vH	8279	11040	14303	14609	14915
CD123	CD123-DART-1- vH	8280	11041	14304	14610	14916
CD123	CD123-DART-2- vH	8281	11042	14305	14611	14917
CD123	CD123-13RB18- vH	8282	11043	14306	14612	14918
CD123	CD123-hu3E3-vH	8283	11044	14307	14613	14919
CD123	CD123-9F6-vH	8284	11045	14308	14614	14920
CD123	CD123-I3RB2-vH	8285	11046	14309	14615	14921
CD123	CD123-1176-vH	8286	11047	14310	14616	14922
CD123	CD123-8B11-vH	8287	11048	14311	14617	14923
CD123	CD123-2B8-vH	8288	11049	14312	14618	14924
CD123	CD123-9D7-vH	8289	11050	14313	14619	14925
CD123	CD123-3B10-vH	8290	11051	14314	14620	14926
CD19	CD19-MEDI- 3649-vH	8291	11052	14315	14621	14927
CD19	CD19-Medrex- 24D1-vH	8292	11053	14316	14622	14928
CD19	CD19-MOR0028-	8293	11054	14317	14623	14929

	vH					
CD19	CD19-HD37-H2L1-vH	8294	11055	14318	14624	14930
CD19	CD19-huBly3-vH	8295	11056	14319	14625	14931
CD19	CD19-huSJ25C1-vH	8296	11057	14320	14626	14932
CD19	CD19-hB4-vH	8297	11058	14321	14627	14933
CD19	CD19-hu-mROO5-1-vH	8298	11059	14322	14628	14934
CD19	CD19-hA19-vH	8299	11060	14323	14629	14935
CD20	CD20-Leu16-vH	8300	11061	14324	14630	14936
CD20	CD20-11B8-vH	8301	11062	14325	14631	14937
CD20	CD20-2C6-vH	8302	11063	14326	14632	14938
CD20	CD20-2H7-vH	8303	11064	14327	14633	14939
CD20	CD20-hA20-vH	8304	11065	14328	14634	14940
CD20	CD20-BM-CA-1925-v4-vH	8305	11066	14329	14635	14941
CD20	CD20-Ubli-v4-vH	8306	11067	14330	14636	14942
CD20	CD20-h1F5-vH	8307	11068	14331	14637	14943
CD20	CD20-7D8-vH	8308	11069	14332	14638	14944
CD20	CD20-AME-33-vH	8309	11070	14333	14639	14945
CD33	CD33-Boehr2800308-vH	8310	11071	14334	14640	14946
CD33	CD33-Him3-4-vH	8311	11072	14335	14641	14947
CD33	CD33-SGNh2H12-vH	8312	11073	14336	14642	14948
CD33	CD33-15G15-33-vH	8313	11074	14337	14643	14949
CD33	CD33-33H4-vH	8314	11075	14338	14644	14950
CD33	CD33-33H4-2-vH	8315	11076	14339	14645	14951
CD33	CD33-9C3-2-vH	8316	11077	14340	14646	14952
CD99	CD99-hu12E7-vH	8317	11078	14341	14647	14953
CLL1	CLL1-21C9-	8318	11079	14342	14648	14954

	L2H3-vH					
CLL1	CLL1-6E7L4H1e-vH	8319	11080	14343	14649	14955
CLL1	CLL1-hu1075-v1-vH	8320	11081	14344	14650	14956
CLL1	CLL1-hu1075-v2-vH	8321	11082	14345	14651	14957
CS1	CS1-PDL241-vH	8322	11083	14346	14652	14958
CS1	CS1-Hu27A-vH	8323	11084	14347	14653	14959
CS1	CS1-ScHu34C3-vH	8324	11085	14348	14654	14960
CS1	CS1-Hu31-D2-vH	8325	11086	14349	14655	14961
CS1	CS1-Luc34-vH	8326	11087	14350	14656	14962
CS1	CS1-LucX2-vH	8327	11088	14351	14657	14963
FITC	FITC-4M-53-vH	8328	11089	14352	14658	14964
FITC	FITC-E2-vH	8329	11090	14353	14659	14965
GPRC5D	GPRC5D-ET150-1-vH	8330	11091	14354	14660	14966
GPRC5D	GPRC5D-ET150-2-vH	8331	11092	14355	14661	14967
HLA-A2	HLA-A2-3PB2-vH	8332	11093	14356	14662	14968
HPV16-E7/MHC класс I	HPV16-7-8-vH	8333	11094	14357	14663	14969
HPV16-E7/MHC класс I	HPV16-2-vH	8334	11095	14358	14664	14970
Тканевой фактор 1 (TF1)	TF1-98-vH	8335	11096	14359	14665	14971
Tn-MUC1	Tn-Muc1-5E5-vH	8336	11097	14360	14666	14972

Ig каппа, легкая цепь	Kappa-LC1-vH	8337	11098	14361	14667	14973
PTK7	PTK7-7C8-vH	8338	11099	14362	14668	14974
PTK7	PTK7-12C6a-vH	8339	11100	14363	14669	14975
CD19	hCD19-EUK5-13-vH	8340	11101	14364	14670	14976
Ras/MHC класс I	Ras-Ab2-vH	8341	11102	14365	14671	14977
Ras/MHC класс I	Ras-Ab4-vH	8342	11103	14366	14672	14978
CLD18A2	CLD18A2-43A11-vH	8343	11104	14367	14673	14979
CLD18A2	CLD18A2-175D10-vH	8344	11105	14368	14674	14980
CD43	CD43-huJL-1-257-10-vH	8345	11106	14369	14675	14981
CD69L	CD69L-DREG200-vH	8346	11107	14370	14676	14982
NY-ESO	NYESO-35-15-vH	8347	11108	14371	14677	14983
P-гликопротеин (MDR1)	Pgp-9F11-vH	8348	11109	14372	14678	14984
Стрептэг	Streptag-vH	8349	11110	14373	14679	14985
BCMA	BCMA-huC13-F12-L1H2-v2-vH	8350	11111	14374	14680	14986
BCMA	BCMA-huC12A3-L3H3-v2-vH	8351	11112	14375	14681	14987
MPL/TPO-R,	Hu-161-2-vH	8352	11113	14376	14682	14988
P-гликопротеин (MDR1)	Pgp-MRK16-vH	8353	11114	14377	14683	14989
CD22	CD22-5-vH	8354	11115	14378	14684	14990
CD22	CD22-10-vH	8355	11116	14379	14685	14991
CD22	CD22-31-vH	8356	11117	14380	14686	14992
CD22	CD22-53-vH	8357	11118	14381	14687	14993
CD22	CD22-65-vH	8358	11119	14382	14688	14994
CD19	hu-FMC65-1-vH	8359	11120	14383	14689	14995
MPL/TPO-R,	MPL-hu-175-2-vH	8360	11121	14384	14690	14996

MPL/TPO-R,	MPL-hu-111-2-vH	8361	11122	14385	14691	14997
CD179a	CD179a-2460-B04-vH	8362	11123	14386	14692	14998
CD179a	CD179a-2462-E07-vH	8363	11124	14387	14693	14999
CD37	CD37-TRU-HL-vH	8364	11125	14388	14694	15000
CD37	huCD37-Boeh-vH	8365	11126	14389	14695	15001
CD70	CD70-13D-vH	8366	11127	14390	14696	15002
CD70	CD70-16D-vH	8367	11128	14391	14697	15003
CD70	CD70-21D-vH	8368	11129	14392	14698	15004
CD70	CD70-1G2D-vH	8369	11130	14393	14699	15005
CD70	CD70-hu-2H5-vH	8370	11131	14394	14700	15006
CD70	CD70-69A7-vH	8371	11132	14395	14701	15007
CD70	CD70-10B4-vH	8372	11133	14396	14702	15008
CD70	CD70-24D-vH	8373	11134	14397	14703	15009
CD70	CD70-25D-vH	8374	11135	14398	14704	15010
HIV1 оболочечный гликопротеин	HIV1-N49P6-vH	8375	11136	14399	14705	15011
HIV1 оболочечный гликопротеин	HIV1-N49P7-vH	8376	11137	14400	14706	15012
HIV1 оболочечный гликопротеин	HIV1-N49P11-vH	8377	11138	14401	14707	15013
HIV1 оболочечный гликопротеин	HIV1-N60P1-1-vH	8378	11139	14402	14708	15014
HIV1 оболочечный гликопротеин	HIV1-N60P25-vH	8379	11140	14403	14709	15015
HIV1 оболочечный	HIV1-N49P9-vH	8380	11141	14404	14710	15016

гликопротеин						
HIV1 оболочечный гликопротеин	HIV1-N60P2-1- vH	8381	11142	14405	14711	15017
HIV1 оболочечный гликопротеин	HIV1-N60P31-1- vH	8382	11143	14406	14712	15018
HIV1 оболочечный гликопротеин	HIV1-N60P22-vH	8383	11144	14407	14713	15019
HIV1 оболочечный гликопротеин	HIV1-N60P38-vH	8384	11145	14408	14714	15020
HIV1 оболочечный гликопротеин	HIV1-N60P30-vH	8385	11146	14409	14715	15021
HIV1 оболочечный гликопротеин	HIV1-N60P36-vH	8386	11147	14410	14716	15022
HIV1 оболочечный гликопротеин	HIV1-N60P39-vH	8387	11148	14411	14717	15023
HIV1 оболочечный гликопротеин	HIV1-N6039-1- vH	8388	11149	14412	14718	15024
HIV1 оболочечный гликопротеин	HIV1-N60P47-vH	8389	11150	14413	14719	15025
HIV1 оболочечный гликопротеин	HIV1-N60P48-vH	8390	11151	14414	14720	15026
HIV1 оболочечный гликопротеин	HIV1-N60P51-vH	8391	11152	14415	14721	15027

HIV1 оболочечный гликопротеин	HIV1-N60P35-vH	8392	11153	14416	14722	15028
HIV1 оболочечный гликопротеин	HIV1-N60P37-vH	8393	11154	14417	14723	15029
Lym1	hu-Lym1-vH	8394	11155	14418	14724	15030
Lym2	hu-Lym2-vH	8395	11156	14419	14725	15031
BCMA	BCMA-USC1-vH	8396	11157	14420	14726	15032
BCMA	BCMA-USC2-vH	8397	11158	14421	14727	15033
BCMA	BCMA-USC3-vH	8398	11159	14422	14728	15034
BCMA	BCMA-USC4-vH	8399	11160	14423	14729	15035
BCMA	BCMA-USC5-vH	8400	11161	14424	14730	15036
BCMA	BCMA-USC6-vH	8401	11162	14425	14731	15037
BCMA	BCMA-USC7-vH	8402	11163	14426	14732	15038
CD43	CD43-huJL-1- 257-10-vH	8403	11164	14427	14733	15039

[00168] ТАБЛИЦА 6С: scFV-фрагменты

МИШЕН Ь	НАЗВАН ИЕ	SEQ ID- ДНК	SEQ ID- БЕЛОК	цель	НАЗВАН ИЕ	SEQ ID- ДНК	SEQ ID- БЕЛОК
CD19	FMC63	8404	11165	CDH17	CDH17- PTA001A 4	8443	11204
CD19	huFMC63- 11	8405	11166	CDH19	CDH19- 16A4	8444	11205
CD19	CD19Bu1 2	8406	11167	EGFR	Цетуксим аб	8445	11206
CD19	CD19MM	8407	11168	CLEC5A	CLEC5A- 8H8F5	8446	11207
CD19	CD19-4G7	8408	11169	CLEC5A	CLEC5A- 3E12A2	8447	11208
HIV1-env	HIV1-H6	8409	11170	CLL1	CLL1- M26	8448	11209

ALK	Alk-48	8410	11171	CLL1	CLL1-M32	8449	11210
ALK	Alk-58	8411	11172	CMVpp65	CMVpp65-F5	8450	11211
Амилоид	Amyloid-158	8412	11173	CS1	CS1-huLuc63	8451	11212
CD45	BC8-CD45	8413	11174	CS1	CS1-HuLuc64	8452	11213
BCMA	BCMA-J6M0	8414	11175	CS1	CS1-huLuc90	8453	11214
BCMA	BCMA-huC12A3-L3H3	8415	11176	CSF2RA	CSF2RA-Ab6	8454	11215
BCMA	BCMA-ET-40	8416	11177	CSF2RA	CSF2RA-Ab1	8455	11216
BCMA	BCMA-ET-54	8417	11178	DLL3	DLL3-hSC16-13	8456	11217
CCR4	CCR4-humAb1567	8418	11179	DLL3	DLL3-hSC16-56	8457	11218
CD5	CD5-9	8419	11180	EBNA3c	EBNA3c-315	8458	11219
CD5	CD5-18	8420	11181	Ebv-gp350	EBV-gp350	8459	11220
CD20	CD20-2F2	8421	11182	EGFRviii	EGFRvIII-139	8460	11221
CD20	CD20-GA101	8422	11183	EGFRviii	EGFRvIII-2173	8461	11222
CD22	CD22-h10F4v2	8423	11184	EpCam1	Epcam1-MM1	8462	11223
CD22	CD22-H22Rhov2ACDRKA	8424	11185	EpCam1	Epcam1-D5K5	8463	11224
CD22	CD22-	8425	11186	FLT3	FLT3-NC7	8464	11225

	m971						
CD30	CD30-5F11	8426	11187	FITC	FITC	8465	11226
CD30	CD30-AC10	8427	11188	Грипп А НА	FLU-MEDI-8852	8466	11227
CD32	CD32-Med9	8428	11189	FR1	FR1-huMov19	8467	11228
CD33	CD33-AF5	8429	11190	GAD	GAD-G3H8	8468	11229
CD33	CD33-huMyc9	8430	11191	GD2	GD2-hu14-18	8469	11230
CD34	CD34-hu4C7	8431	11192	GD2	GD2-hu3F8	8470	11231
CD44v6	CD44v6-Biwa8	8432	11193	GD3	GD3-KM-641	8471	11232
CD70	CD70-h1F6	8433	11194	GFRa4	GFRAlpha4-P4-6	8472	11233
CD79b	CD79b-2F2	8434	11195	GFRa4	GFRa4-P4-10	8473	11234
CD123	CD123-CSL362	8435	11196	GM1	GM1-5B2	8474	11235
CD138	CD138	8436	11197	GM1	GM1-7E5	8475	11236
CD179b	CD179b	8437	11198	GPRC5D	GPRC5D-ET150-5	8476	11237
CD276	CD276-17	8438	11199	GPRC5D	GPRC5D-ET150-18	8477	11238
CD324	CD324-SC10-6	8439	11200	gp100	gp100	8478	11239
CD324	CD324-hSC10-17	8440	11201	gp100	gp100-G2D12	8479	11240
CDH6	CDH6-NOV710	8441	11202	GPC3	GPC3-4E5	8480	11241
CDH6	CDH6-	8442	11203	GPNMB	gpNMB-	8481	11242

	NOV712				115		
GRP78	GRP78-GC18	8482	11243	PDL1	PDL1-SP142	8522	11283
HIV1-gag (77-85)	HIV1-E5	8483	11244	PDL1	PDL1-10A5	8523	11284
HIV1-env	HIV1-3BNC117	8484	11245	PSCA	PSCA-Ha14-121	8524	11285
HIV1-env	HIV1-PGT-128	8485	11246	PSCA	PSCA-Ha14-117	8525	11286
HIV1-env	HIV1-VR-C01	8486	11247	PR1	PR1	8526	11287
HIV1-env	HIV1-X5	8487	11248	PSMA	PSMA-006	8527	11288
HMW-MAA	HMV-MAA-hIND	8488	11249	PSMA	PSMA-J591	8528	11289
HTLV1-TAX	HTLV-TAX-T3F2	8489	11250	PTK7	PTK7-hSC6-23	8529	11290
HTLV1-TAX	HTLV-TAX-T3E3	8490	11251	PTK7	PTK7-SC6-10-2	8530	11291
IL11Ra	IL11Ra-8E2-Ts107	8491	11252	ROR1	ROR1-4A5	8531	11292
IL13Ra2	IL13Ra2-hu107	8492	11253	ROR1	ROR1-4C10	8532	11293
IL13Ra2	IL13Ra2-Hu108	8493	11254	Мезотелин	SD1-vHH-Linker-SD2-vHH	8533	11294
KSHV-K8.1	KSHV-4C3	8494	11255	SLea	SLea -7E3	8534	11295
LAMP1	LAMP1-humab1-2	8495	11256	SLea	SLea -5B1	8535	11296

LAMP1	LAMP1-Mb4	8496	11257	SSEA4	SSEA4	8536	11297
LewisY	LewisY-huS193	8497	11258	TCRB1	TCRb1-CP01-E09	8537	11298
L1CAM	L1CAM-9-3-HU3	8498	11259	TCRB1	TCRB1-Jovi1	8538	11299
Lym1	Lym1	8499	11260	TCRB2	TCRB2-CP01-D05	8539	11300
Lym2	Lym2	8500	11261	TCRb2	TCRB2-CP01-E05	8540	11301
CD79b	huMA79bv28	8501	11262	TCRgd	TCRgd-G5-4	8541	11302
MART1	MART1-CAG10	8502	11263	TERT	TERT-4A9-T540	8542	11303
MART1	MART1-CLA12	8503	11264	TERT	TERT-3G3-T865	8543	11304
Мезотелин	Mesotelin-m912	8504	11265	TGFBR2	TGFBR2-Ab1	8544	11305
MPL	MPL-175	8505	11266	TIM1	TIM1-HVCR1-270-2	8545	11306
MPL	MPL-161	8506	11267	TIM1	TIM1-HVCR1-ARD5	8546	11307
MPL	MPL-161-HL	8507	11268	TnAg	TnAg	8547	11308
MPL	MPL-111	8508	11269	Tn-Muc1	TnMuc1-hu5E5-RHA8-PKA-2	8548	11309
MPL	MPL-178	8509	11270	TROP2	TROP2-ARA47-HV3KV3	8549	11310
MPL	MPL-	8510	11271	TROP2	TROP2-	8550	11311

	AB317				h7E6-SVG		
MPL	MPL-12E10	8511	11272	TSHR	TSHR-K1-70	8551	11312
MPL	MPL-huVB22Bw5	8512	11273	TSHR	TSHR-KB1	8552	11313
Muc1	MUC1-D6-M3B8	8513	11274	TSHR	TSHR-5C9	8553	11314
Muc1	MUC1-D6-M3A1	8514	11275	TSLRP	TSLRP	8554	11315
Muc16	Muc16-4H11	8515	11276	Тирозина за	Tyros-B2	8555	11316
EGFR	Нимотузу маб	8516	11277	Тирозина за	Tyros-MC1	8556	11317
NKG2D	NKG2D-MC	8517	11278	Тирозина за	Tyros-TA2	8557	11318
NYBR1	NYBR1	8518	11279	VEGFR3	VEGFR3-Ab1	8558	11319
NY-ESO	NYESO-T1	8519	11280	WT1	WT1-Ab1	8559	11320
NY-ESO	NYESO-T1	8520	11281	WT1	WT1-ab5	8560	11321
PDL1	PDL1-Atezoli	8521	11282	WT1	WT1-Ab13	8561	11322
WT1	WT1-Ab15	8562	11323	CD22	CD22-65	8658	11356
CD123	CD123-1172	8563	11324	CD19	hu-FMC65	8659	11357
CDH19	CDH19-4B10	8564	11325	MPL	MPL-hu-175-2	8660	11358
FRbeta	FRbeta-m923	8565	11326	MPL	MPL-hu-111-2	8661	11359
LHR-8B7	LHR-8B7	8566	11327	CD179a	CD179a-	8662	11360

					2460-B04		
LHR-5F4-21	LHR-5F4-21	8567	11328	CD179a	CD179a-2462-E07	8663	11361
B7H4	B7H4-hu22C10	8568	11329	CD37	CD37-TRU-HL	8664	11362
B7H4-hu1D11	B7H4-hu1D11	8569	11330	CD37	huCD37-Boeh	8665	11363
IgE	IgE-Omalizumab	8570	11331	CD70	CD70-13D	8666	11364
CD23	CD23-p5E8	8571	11332	CD70	CD70-16D	8667	11365
GCC	GCC-5F9	8572	11333	CD70	CD70-21D	8668	11366
GCC	GCC-Ab229	8573	11334	CD70	CD70-1G2D	8669	11367
CD200R	CD200R-huDx182	8637	11335	CD70	CD70-hu2H5	8670	11368
Tn-Muc1-5E5	Tn-Muc1-5E5	8638	11336	CD70	CD70-69A7	8671	11369
Igk, легкая цепь	Kappa-LC1	8639	11337	CD70	CD70-10B4	8672	11370
PTK7	PTK7-7C8	8640	11338	CD70	CD70-24D	8673	11371
PTK7	PTK7-12C6a	8641	11339	CD70	CD70-25D	8674	11372
CD19	hCD19-EUK5-13	8642	11340	HIV1-env	HIV1-N49P6	8675	11373
Ras	Ras-Ab2	8643	11341	HIV1-env	HIV1-N49P7	8676	11374
Ras	Ras-Ab4	8644	11342	HIV1-env	HIV1-N49P11	8677	11375
CLD18A2	CLD18A2-43A11	8645	11343	HIV1-env	HIV1-N60P1-1	8678	11376
CLD18A2	CLD18A2	8646	11344	HIV1-env	HIV1-	8679	11377

	-175D10				N60P25		
CD43	CD43- huJL-1- 257-10	8647	11345	HIV1-env	HIV1- N49P9	8680	11378
CD69L	CD69L- DREG- 200	8648	11346	HIV1-env	HIV1- N60P2-1	8681	11379
NY-ESO	NYESO- 35-15	8649	11347	HIV1-env	HIV1- N60P31-1	8682	11380
Pgp	Pgp-9F11	8650	11348	HIV1-env	HIV1- N60P22	8683	11381
Стрептэг	Стрептэг	8651	11349	HIV1-env	HIV1- N60P38	8684	11382
MPL	Hu-161-2	8652	11350	HIV1-env	HIV1- N60P30	8685	11383
Pgp	Pgp MRK16	8653	11351	HIV1-env	HIV1- N60P36	8686	11384
CD22	CD22-5	8654	11352	HIV1-env	HIV1- N60P39	8687	11385
CD22	CD22-10	8655	11353	HIV1-env	HIV1- N6039.1	8688	11386
CD22	CD22-31	8656	11354	HIV1-env	HIV1- N60P47	8689	11387
CD22	CD22-53	8657	11355	HIV1-env	HIV1- N60P48	8690	11388
HIV1-env	HIV1- N60P51	8691	11389	BCMA	BCMA- USC3	8698	11396
HIV1-env	HIV1- N60P35	8692	11390	BCMA	BCMA- USC4	8699	11397
HIV1-env	HIV1- N60P37	8693	11391	BCMA	BCMA- USC5	8700	11398
Lym1	hu-Lym1	8694	11392	BCMA	BCMA- USC6	8701	11399
Lym2	hu-Lym2	8695	11393	BCMA	BCMA-	8702	11400

					USC7		
BCMA	BCMA- USC1	8696	11394	CD33	CD33- SGNh2H1 2	8727	15099
BCMA	BCMA- USC2	8697	11395	CD33	CD33- 15G15-33	8728	15100
CD19	CD19- MEDI- 3649	8698	15070	CD33	CD33- 33H4	8729	15101
CD19	CD19- Medrex- 24D1	8699	15071	CD33	CD33- 9C3-2	8730	15102
CD19	CD8SP- Ritx- CD19- MOR0028	8700	15072	CD99	CD99- hu12E7	8731	15103
CD19	CD19- HD37- H2L1	8701	15073	CD123	CD123- DART1-1	8732	15104
CD19	CD19- huBly3	8702	15074	CD123	CD123- DART1-2	8733	15105
CD19	CD19- huSJ25C1	8703	15075	CD123	CD123- I3RB18	8734	15106
CD19	CD8SP- Ritx- CD19-hB4	8704	15076	CD123	CD123- hu3E3	8735	15107
CD19	CD19-hu- mROO5-1	8705	15077	CD123	CD123- 9F6	8736	15108
CD19	CD19- hA19	8706	15078	CD123	CD123- I3RB2	8737	15109
AFP/MH C I	AFP-61	8707	15079	CD123	CD123- 1176	8738	15110
AFP/MH C I	AFP-76	8708	15080	CD123	CD8SP- Ritx2-	8739	15111

					CD123-8B11		
AFP/MH C I	AFP-79	8709	15081	CD123	CD123-2B8	8740	15112
BCMA	BCMA-ET-03	8710	15082	CD123	CD123-9D7	8741	15113
BCMA	BCMA-huC11.D5.3L1H3	8711	15083	CD123	CD123-3B10	8742	15114
BCMA	BCMA-huC13-F12	8712	15084	CLL1	CLL1-21C9-L2H3	8743	15115
CD20	CD20-11B8	8713	15085	CLL1	CLL1-6E7L4H1e	8744	15116
CD20	CD20-2C6	8714	15086	CLL1	CLL1-hu1075-v1	8745	15117
CD20	CD20-2H7	8715	15087	CLL1	CLL1-hu1075-v2	8746	15118
CD20	CD20-hA20	8716	15088	CS1	CS1-PDL241	8747	15119
CD20	CD20-BM-CA-1925-v4	8717	15089	CS1	CS1-Hu27A	8748	15120
CD20	CD20-Ubli-v4	8718	15090	CS1	CS1-ScHu34C3	8749	15121
CD20	CD20-2H7	8719	15091	CS1	CS1-Hu31-D2	8750	15122
CD20	CD20-h1F5	8720	15092	CS1	CS1-Luc34	8751	15123
CD20	CD20-7D8	8721	15093	CS1	CS1-LucX2	8752	15124
CD20	CD20-7D8-vL-linker-GA-	8722	15094	FITC	FITC-4M-53	8753	15125

	Tag-VH						
CD20	CD20- AME-33	8723	15095	FITC	FITC-E2- HL	8754	15126
CD43	CD43- huJL-1- 257-10	8703	11401	GPRC5D	GPRC5D- ET150-1	8755	15127
CD22	CD22- m971-HL	8724	15096	GPRC5D	GPRC5D- ET150-2	8756	15128
CD33	CD8SP- Ritx2- BC33- Bochr2800 308	8725	15097	HLA-A2	HLA-A2- 3PB2	8757	15129
CD33	CD8SP- Ritx2- CD33- Him3-4	8726	15098	HPV16/M HC I	HPV16-7- 8	8758	15130
TF1	TF1-98	8760	15132	HPV16/M HC I	HPV16-2	8759	15131

[00169] ТАБЛИЦА 6D: КОМПОНЕНТЫ CAR

Компонент CAR	SEQ ID NO (ДНК)	SEQ ID NO (БЕЛОК)	компонент CAR	SEQ ID NO (ДНК)	SEQ ID NO (БЕЛОК)
F2A	925	4838	IgG1-CH1-TCRd- 6MD	962	4875
T2A	926	4839	IgG1-CH1-TCRa- SDVP-6MD	963	4876
P2A	928	4841	IgG1-CH1-TCRa- wt2-opt-6MD	964	4877
E2A	930	4843	hTCRa-WT	3885	15041
SGSG Линкер	931	4844	hTCRa-CSDVP	3886	15042
САЙТ ФУРИНА	933	4846	hTCRa-opt2	3887	15043
hCD8-шарнир-ТМ	936	4849	hTCRa-T48C-opt	3889	15045

hCD8-шарнир- TM-BBz	937	4850	hTCRa-S61R	3892	15048
4-1BB- цитозольный- домен	939	4852	hTCR-b1- константная	3895	15051
CD3z- цитозольная- домен	940	4853	hTCR-b2- константная	3896	15052
CD28-шарнир- TM-CP	942	4855	hTCRb-WT	3897	15053
CD3d-ECDTMCP- opt2	944	4857	hTCRb-S57C-opt1	3898	15054
CD3eECDTMCP- opt2	948	4861	hTCRb-KACIAH	3899	15055
CD3g-ECDTMCP- opt2	949	4862	hTCRb-opt2	3900	15056
CD3zECDTMCP- opt2	958	4871	hTCRb-R79G	3910	15066
IgCL-TCRg-6MD	959	4872	hTCRg- (hTCR- гамма)	3912	15068
IgCL-TCRb-IAH- 6MD	960	4873	hTCR- (hTCR- дельта)	3913	15069
IgCL-TCRb-wt2- opt-6MD	961	4874	CD8- сигнальный пептид	1	3914
IgH-сигнальный пептид	5	3918	(GGGGS) x3_ЛИНКЕР	278	4191
Мус-Тэг	903	4816	V5 Тэг	908	4821
RiTX2-TAG	918	4831	RITX4 TAG	919	4832
PG4SP	288	4201	EAAAK	292	4205
PG4SP-v2-U	289	4202	EAAAK-v2	293	4206
E-спираль	290	4203	K-спираль	291	4204
TCRa-opt-6MD	15141	15133	TCRg-6MD	15143	15135
TCRb-opt-6MD	15142	15134	TCRd-6MD	15144	15136

[00170] ТАБЛИЦА 7: ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ

МОДУЛИ

Вспомогательный модуль	SEQ ID NO (ДНК)	SEQ ID NO (БЕЛОК)	Вспомогательный модуль	SEQ ID NO (ДНК)	SEQ ID NO (БЕЛОК)
K13-opt	7768	10538	IKK1-S176E-S180E	1004	4917
K13-vFLIP	972	4885	FKBPx2-hNEMO-K277A	1006	4919
FKBP-K13	973	4886	FKBPx2-hNEMO-L753 (251)	1007	4920
FKBPX2-K13	974	4887	FKBPx2-hNEMO-L600 (200)	1008	4921
Myr-FKBPx2-K13	975	4888	FKBPx2-RIP-ID	1009	4922
FKBPx2-HTLV2-Tax-RS	976	4889	hNEMO-FL-GS-FKBPv36X2	7763	10533
FKBPx2-Flag-HTLV2-Tax-RS	977	4890	hNEMO-L825-GS-FKBPv36x2	7764	10534
hNEMO-K277A	979	4892	hNEMO-L753-GS-FKBPv36x2	7765	10535
hNEMO-D23V-K277A	980	4893	hNEMO-L600-GS-FKBPv36x2	7766	10536
hNEMO-K277A-L1161	986	4899	hNEMO-K277A-Delta-V249-K255	7767	10537
hNEMO-K277A-L1014	989	4902	IKK1-delta-SCD-FKBPv36x2	7781	10541
mNEMO-K270A	992	4905	IKK2-delta-SCD-FKBPv36x2	7782	10542
RIP-ID	998	4911	TCL-1A	1005	4918

MyD88	999	4912	MTCP-1	7769	10539
MyD88-L265P	1000	4913	CMV-141	7770	10540
IKK2	1001	4914	IgSP-[hTRAC- opt2]	1010	4923
IKK2-S177E- S181E	1002	4915	IgSP-[hTRBC- opt2]	1011	4924
IKK1	1003	4916			
IGSP-TCRa-opt- 6MD	15145	15137	IGSP-TCRg-6MD	15147	15139
IGSP-TCRb-opt- 6MD	15146	15138	IGSP-TCRd-6MD	15148	15140

[00171] **ТАБЛИЦА 8: Ограниченные по МНС I (HLA-A2) пептиды, используемые для генерации CAR**

Белок/Эпитоп	SEQ ID NO:	Белок/Эпитоп	SEQ ID NO:
gp100	10511	MART (26-35)	10521
gp100	10512	EBNA-3A (596-604)	10522
gp100	10513	EBNA-3c	10523
MUC1-A7 (130-138)	10514	WT1	10524
MUC1-D6 (13-21)	10515	PR1	10525
НАЛОГ (11-19)	10516	Ras9-G12V	10526
hTERT (540-548)	10517	HPV16-E7	10527
hTERT (865-873)	10518	NY-ESO-1- (155-163)	10528
HIV1 gag (77-85)	10519	NY-ESO-1- (157-165)	10529
CMV-pp65 (495-503)	10520	NY-ESO-1- (157-167)	10530

[00172] **Таблица 9 :**

CAR/BiTE «X» МИШЕНЬ	ИЛЛЮСТРАТИВНАЯ БОЛЕЗНЬ-МИШЕНЬ CAR (т.е. обычных CAR и CAR следующего поколения. Например, SIR, Ab-TCR и TFP) и биспецифических ловушек Т-клеток (BiTE)
CD19	ОЛЛ, ХЛЛ, лимфома, лимфоидный бластный криз ХМЛ, миеломная болезнь, иммунные нарушения
ALK	Немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), ALCL (анапластическая крупноклеточная лимфома), ИМТ (воспалительная миофибробластная опухоль) или нейробластома

CD45	Рак крови
BCMA	Миелома, PEL, плазматический лейкоз, макроглобинемия Вальденстрема
CD5	Рак крови, Т-клеточный лейкоз, Т-клеточная лимфома
CD20	Рак крови, лейкоз, ОЛЛ, ХЛЛ, лимфома, иммунные нарушения
CD22	Рак крови, лейкоз, ОЛЛ, ХЛЛ, лимфома, лимфоидный бластный криз ХМЛ, иммунные нарушения
CD23	Рак крови, лейкоз, ОЛЛ, ХЛЛ, лимфома, аутоиммунные нарушения
CD30	Лимфома Ходжкина, кожная Т-клеточная лимфома
CD32	Солидные опухоли
CD33	Рак крови, ОМЛ, МДС
CD34	Рак крови, ОМЛ, МДС
CD44v6	Рак крови, ОМЛ, МДС
CD70	Рак крови, лимфома, миелома, макроглобулинемия Вальденстрема, рак почки
CD79b	Рак крови, ОЛЛ, лимфома
CD123	Рак крови, ОМЛ, МДС
CD138	Рак крови, миелома, PEL (pure erythroid leukemia), плазматический лейкоз, макроглобулинемия Вальденстрема
CD179b	Рак крови, ОЛЛ, лимфома
CD276/B7-H3	Саркома Юинга, нейробластома, рабдомиосаркома, рак яичников, колоректальный рак и рак легких
CD324	Солидные опухоли, рак пищевода, рак простаты, колоректальный рак, рак молочной железы, рак легких
CDH6	Солидные опухоли, рак почек, яичников, щитовидной железы
CDH17	Аденокарциномы, рак желудочно-кишечного тракта, легких, яичников, эндометрия
CDH19	Солидная опухоль, меланома

EGFR	Рак толстой кишки, рак легких
CLEC5A	Рак крови, лейкоз, ОМЛ
GR/LHR	Рак простаты, рак яичников или рак молочной железы
CLL1	Рак крови, лейкоз
CMVpp65	ЦМВ-инфекция, ЦМВ-колит, ЦМВ-пневмонит
CS1	Рак крови, миелома, РЕЛ, лейкоз плазматических клеток
CSF2RA	ОМЛ, ХМЛ, МДС
CD123	Рак крови, ОМЛ, МДС
DLL3	Меланома, рак легких или рак яичников
EBNA3c/МНС I	Вирус Эпштейна-Барра и сопутствующие заболевания, включая рак
EBV-gp350	Вирус Эпштейна-Барра и сопутствующие заболевания
EGFR	Солидные опухоли, рак толстой кишки, рак легких
EGFRvIII	Солидные опухоли, глиобластома
ErCam1	Рак желудочно-кишечного тракта
FLT3	Рак крови, ОМЛ, МДС, ОЛЛ
Альфа-рецептор фолата (FR1 или FOLR1)	Рак яичников, NSCLC, рак эндометрия, рак почки или другие твердые опухоли
FSHR	Рак простаты, рак яичников или рак молочной железы
GD2	нейробластома
GD3	меланома
GFRa4	Рак, медуллярный рак щитовидной железы
Фукозил-GM1 (GM1)	Мелкоклеточный рак легкого
GPRC5D	Миелома, РЕЛ, плазматический лейкоз, макроглобулинемия Вальденстрема
gp100	меланома

GPC3	Солидные опухоли, рак легких
gpNMB	Меланома, опухоли головного мозга, рак желудка
GRP78	миелома
Her2	Солидные опухоли, рак молочной железы, рак желудка
Her3	Колоректальный рак молочной железы
HMW-MAA	меланома
HTLV1-TAX/MHC I	Заболевания, связанные с инфекцией HTLV1, Т-клеточный лейкоз-лимфома взрослых
IL11Ra	Рак крови, ОМЛ, ОЛЛ, ХМЛ, МДС, саркомы
IL6Ra	Солидные опухоли, рак печени
IL13Ra2	Глиобластомы
KSHV-K8.1	Саркома Капоши, PEL, многоочаговая болезнь Каслмана
LAMP1	Рак крови, ОМЛ, ОЛЛ, МДС, ХЛЛ, ХМЛ
LewisY	Рак
L1CAM	Солидные опухоли, рак яичников, рак молочной железы, рак эндометрия, меланома
LHR	Рак простаты, рак яичников или рак молочной железы
Lym1	Рак крови, лейкоз, лимфома
Lym2	Рак крови, лейкоз, лимфома
CD79b	Рак крови, лимфома
MART1/MHC I	Меланома
Мезотелин	Мезотелиома, рак яичников, рак поджелудочной железы
Muc1/MHC I	Рак молочной железы, рак желудка, колоректальный рак, рак легкого или другие твердые опухоли
Muc16	Рак яичников
NKG2D	Лейкоз, лимфома или миелома
NYBR1	Рак молочной железы
PSCA	Рак простаты
PR1/MHC I	Рак крови, лейкоз

Пролактиновый рецептор	Рак молочной железы, хромофобный почечно-клеточный рак
PSMA	Рак простаты
PTK7	Меланома, рак легких или рак яичников
ROR1	Рак крови, В-клеточное злокачественное образование, лимфома, ХЛЛ
Л	Рак поджелудочной железы, рак толстой кишки
SSEA4	Панкреатический рак
Тирозиназа/МНС I	Меланома
TCRB1	Т-клеточные лейкозы и лимфомы, аутоиммунные нарушения
TCRB2	Т-клеточные лейкозы и лимфомы, аутоиммунные нарушения
TCRgd	Т-клеточные лейкозы и лимфомы, аутоиммунные нарушения
hTERT	Солидные опухоли, рак крови
TGFBR2	Солидные опухоли, келоид
TIM1/HAВCR1	Рак почки, рак печени
TROP2	Солидные опухоли, рак молочной железы, рак простаты
TSHR	Рак щитовидной железы, Т-клеточный лейкоз, Т-клеточная лимфома
TSLPR	Рак крови, лейкозы, ОМЛ, МДС
Тирозиназа/МНС I	Меланома
VEGFR3	Солидные опухоли
WT1/МНС I	Раки крови, ОМЛ
Фолатный рецептор	ОМЛ, миелома
B7H4	Рак молочной железы или рак яичников
CD23	Рак крови, лейкозы, ХЛЛ
GCC	Рак желудочно-кишечного тракта
CD200R	Рак крови, ОМЛ, МДС
AFP/МНС I	Солидные опухоли, рак печени

CD99	Рак печени
GPRC5D	Миелома, макроглобинемия Вальденстрема
HPV16- E7/МНС I	HPV16-ассоциированные раковые заболевания, рак шейки матки, рак головы и шеи
Тканевой фактор 1 (TF1)	Солидные опухоли
Tn-Muc1	Солидные опухоли и рак крови
Igk, легкая цепь	Миелома, плазматический лейкоз
Ras G12V/МНС I	Солидные опухоли и рак крови
CLD18A2 (Клодин 18.2)	Рак желудка, поджелудочной железы, пищевода, яичников или легких
CD43	Раки крови, ОМЛ
NY-ESO- 1/МНС I	Миелома
MPL/TPO-R,	Рак крови, ОМЛ, МДС, ХМЛ, ОЛЛ
P-гликопротеин (MDR1)	Рак почки, рак печени, миелома
CD179a	Рак крови, острый лейкоз, ХЛЛ, ОЛЛ, лимфома
STEAP1	Рак желудка или простаты или лимфома
Liv1 (SLC39A6)	Рак молочной железы или простаты
Нектин4 (PVRL4)	Рак мочевого пузыря, почек, шейки матки, легких, головы и шеи или молочной железы
Крипто (TDGF1)	Колоректальный рак или рак эндометрия или рак яичников
gpA33	Колоректальный рак или рак эндометрия или рак яичников
FLT3	Рак крови, ОМЛ, ОЛЛ, МДС
BST1/CD157	Рак крови, ОМЛ, МДС
IL1RAP	Рак печени, колоректальный рак, рак шеи, рак легких или рак

	яичников
Хлоридный канал	Глиома
IgE	Аллергия
HLA-A2	Болезнь трансплантат против хозяина, отторжение ткани (SIR, экспрессируемый в регуляторных Т клетках)
Амилоид	Амилоидозы, болезнь Альцгеймера
HIV1-env	HIV/СПИД и родственные состояния
HIV1-gag	HIV1/СПИД и родственные состояния
Грипп А НА	Инфекция гриппа А

[00173] Таблица 10: Иллюстративные CAR, нацеленные на гликопротеин оболочки HIV-1 на основе связывающих доменов vL и vH для HIV1-N49P6

ТИП CAR	Вспомогательный модуль	НАЗВАНИЕ CAR	SEQ ID NO (ДНК)	SEQ ID NO (БЕЛОК)
2-е поколение CAR	Нет	CD8SP-HIV1-N49P6-vL-Gly-Ser-Linker-HIV1-N49P6-vH-Myc-CD8TM-BBz	8704	11402
2-е поколение CAR	Нет	CD8SP-HIV1-N49P6-vH-Gly-Ser-Linker-vL-Myc-CD8TM-BBz	8705	11403
1-е поколение CAR	vFLIP-K13	CD8SP-HIV1-N49P6-vL-Gly-Ser-Linker-HIV1-N49P6-vH-Myc-CD8TM-z-P2A-K13	8706	11404
1-е поколение CAR	hNEMO-K277A	CD8SP-HIV1-N49P6-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A	8707	11405
TFP	hNEMO-K277A	CD8SP-HIV1-N49P6-(vL-vH)-CD3e-ECDTMCP-opt2-	8708	11406

		P2A-hNEMO-K277A		
TFP	hNEMO-K277A	CD8SP-HIV1-N49P6-(vL-vH)-CD3d-ECDTMCP-opt2-P2A-hNEMO-K277A	8709	11407
TFP	hNEMO-K277A	CD8SP-HIV1-N49P6-(vL-vH)-CD3g-ECDTMCP-opt2-P2A-hNEMO-K277A	8710	11408
TFP	hNEMO-K277A	CD8SP-HIV1-N49P6-(vL-vH)-CD3z-ECDTMCP-opt2-P2A-hNEMO-K277A	8711	11409
TFP	hNEMO-K277A	CD8SP-HIV1-N49P6-(vH-vL)-CD3e-ECDTMCP-opt2-P2A-hNEMO-K277A	8712	11410
TFP	hNEMO-K277A	CD8SP-HIV1-N49P6-(vH-vL)-CD3d-ECDTMCP-opt2-P2A-hNEMO-K277A	8713	11411
TFP	hNEMO-K277A	CD8SP-HIV1-N49P6-(vH-vL)-CD3g-ECDTMCP-opt2-P2A-hNEMO-K277A	8714	11412
TFP	hNEMO-K277A	CD8SP-HIV1-N49P6-(vH-vL)-CD3z-ECDTMCP-opt2-P2A-hNEMO-K277A	8715	11413
ДК SIR	Her	CD8SP-HIV1-N49P6-vL-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-HIV1-N49P6-vH-[hTCRa-CSDVP]	8716	11414
ДК SIR	Her	CD8SP-HIV1-N49P6-vL-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-HIV1-N49P6-vH-[hTCRb-	8717	11415

		KACIAH]		
ДК SIR	Her	CD8SP-HIV1-N49P6-vL-PG4SP-v2-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-HIV1-N49P6-vH-PG4SP-[hTCRa-CSDVP]	8718	11416
ДК SIR	Her	CD8SP-HIV1-N49P6-vL-E-Coil-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-HIV1-N49P6-vH-K-Coil-[hTCRa-CSDVP]	8719	11417
ДК SIR	Her	CD8SP-HIV1-N49P6-vL-EAAAK-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-HIV1-N49P6-vH-EAAAK-v2-[hTCRa-CSDVP]	8720	11418
ДК SIR	Her	CD8SP-HIV1-N49P6-vL-V5-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-HIV1-N49P6-vH-Myc4-[hTCRa-CSDVP]	8721	11419
ДК SIR	hNEMO-K277A	CD8SP-HIV1-N49P6-vL-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-HIV1-N49P6-vH-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-hNEMO-K277A	8722	11420
ДК SIR	hNEMO-K277A	CD8SP-HIV1-N49P6-vL-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-HIV1-N49P6-vH-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-hNEMO-K277A	8723	11421
Ab-TCR	hNEMO-K277A	CD8SP-HIV1-N49P6-vL-[IgCL-TCRg-6MD]-F-P2A-	8724	11422

		SP-HIV1-N49P6-vH-[IgG1-CH1-TCRd-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A		
Ab-TCR	hNEMO-K277A	CD8SP-HIV1-N49P6-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-HIV1-N49P6-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	8725	11423
Ab-TCR	hNEMO-K277A	CD8SP-HIV1-N49P6-vL-[IgCL-TCRb-wt2-opt-6MD]-F-P2A-SP-HIV1-N49P6-vH-[IgG1-CH1-TCRa-wt2-opt-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	8726	11424
1-е поколение CAR	hNEMO-K277A-Delta-V249-K255	CD8SP-HIV1-N49P6-vL-Gly-Ser-Linker-HIV1-N49P6-vH--CD8TM-z-P2A-hNEMO-K277A-Delta-V249-K255	8727	11425
1-е поколение CAR	IKK2-S177E-S181E	CD8SP-HIV1-N49P6-vL-Gly-Ser-Linker-HIV1-N49P6-vH--CD8TM-z-P2A-IKK2-S177E-S181E	8728	11426
ДК SIR	hNEMO-K277A	CD8SP-HIV1-N49P6-vL-[hTCRa-T48C]-F-F2A-SP-HIV1-N49P6-vH-[hTCRb-S57C]-F-P2A-hNEMO-K277A	8729	11427
ДК SIR	IKK1-S176E-S180E	CD8SP-HIV1-N49P6-vL-[hTCRb-S57C]-F-P2A-SP-HIV1-N49P6-vH-[hTCRa-	8730	11428

		T48C]-F-F2A-IKK1-S176E-S180E		
ДК SIR	hNEMO-K277A-Delta-V249-K255	CD8SP-HIV1-N49P6-vL-[hTCRb-S57C]-F-P2A-SP-HIV1-N49P6-vH-[hTCRa-T48C]-F-F2A-hNEMO-K277A-Delta-V249-K255	8731	11429
OHC SIR	Her	CD8SP-MYC-[hTCRa-T48C-opt1]-F-F2A-SP-HIV1-N49P6-vL-Gly-Ser-Linker-HIV1-N49P6-vH-V5-[hTCRb-S57C-opt1]	8732	11430
ДК SIR	Her	CD8SP-HIV1-N49P6-vL-V5-[hTCRb-S57C-opt]-F-P2A-SP-HIV1-N49P6-vH-Myc-[hTCRa-T48C-opt]	8733	11431
ДК SIR	Her	CD8SP-HIV1-N49P6-vL-[hTCRb-opt2]-F-P2A-SP-HIV1-N49P6-vH-[hTCRa-opt2]	8734	11432
ДК SIR	Her	CD8SP-HIV1-N49P6-vL-[hTCRb-opt2]-F-P2A-SP-HIV1-N49P6-vH-Myc-[preTCRa-Del48]	8735	11433
OHC SIR	Her	CD8SP-[hTCRb-opt2]-F-P2A-CD8SP-HIV1-N49P6-vL-Gly-Ser-Linker-HIV1-N49P6-vH-Myc4-[preTCRa-Del48]	8736	11434
ДК SIR	Her	CD8SP-HIV1-N49P6-vL-V5-[hTCRg1-opt]-F-P2A-SP-	8737	11435

		HIV1-N49P6-vH-Мус- [hTCRd-opt]		
--	--	-----------------------------------	--	--

[00174] Сокращения; 1-е поколение CAR, Первое поколение CAR; 2-е поколение CAR, Второе поколение CAR; ДК SIR, двухцепочечный SIR; ОНС SIR, полторацепочечный SIR.

[00175] Дополнительные модули в приведенных выше иллюстративных конструкциях в Таблице 10 являются необязательными и могут быть удалены или заменены другими вспомогательными модулями.

[00176] **ТАБЛИЦА 11: SEQ ID NO CAR, СОДЕРЖАЩИХ РАЗЛИЧНЫЕ АНТИГЕННЕСВЯЗЫВАЮЩИЕ ДОМЕНЫ, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ В КАЧЕСТВЕ ЭТАЛОНА SEQ ID NO CAR HIV1-N49P6**

Целевой антиген	Антигенсвязывающий домен	CAR SEQ ID NO (ДНК)	CAR SEQ ID NO (БЕЛОК)
HIV1 Env	HIV1-N49P6	8704-8737	11402-11435
HIV1 Env	HIV1-N49P7	8738-8771	11436-11469
HIV1 Env	HIV1-N49P11	8806-8839	11504-11537
HIV1 Env	HIV1-N60P1-1	8840-8873	11538-11571
HIV1 Env	HIV1-N60P25	8942-8975	11640-11673
HIV1 Env	HIV1-N49P9	8772-8805	11470-11503
HIV1 Env	HIV1-N60P2-1	8874-8907	11572-11605
HIV1 Env	HIV1-N60P31-1	9010-9043	11708-11741
HIV1 Env	HIV1-N60P22	8908-8941	11606-11639
HIV1 Env	HIV1-N60P38	9146-9179	11844-11877
HIV1 Env	HIV1-N60P30	8976-9009	11674-11707
HIV1 Env	HIV1-N60P36	9078-9111	11776-11809
HIV1 Env	HIV1-N60P39	9180-9213	11878-11911
HIV1 Env	HIV1-N6039-1	9316-9349	12014-12047

HIV1 Env	HIV1-N60P47	9214-9247	11912-11945
HIV1 Env	HIV1-N60P48	9248-9281	11946-11979
HIV1 Env	HIV1-N60P51	9282-9315	11980-12013
HIV1 Env	HIV1-N60P35	9044-9077	11742-11775
HIV1 Env	HIV1-N60P37	9112-9145	11810-11843
Lym1	hu-Lym1	10370-10403	13068-13101
Lym2	hu-Lym2	10404-10437	13102-13135
BCMA	BCMA-USC1	9418-9451	12116-12149
BCMA	BCMA-USC2	9452-9485	12150-12183
BCMA	BCMA-USC3	9486-9519	12184-12217
BCMA	BCMA-USC4	9520-9554	12218-12252
BCMA	BCMA-USC5	9555-9587	12253-12285
BCMA	BCMA-USC6	9588-9621	12286-12319
BCMA	BCMA-USC7	9622-9655	12320-12353
CD43	CD43-huJL-1-257-10	9758-9791	12456-12489
BCMA	BCMA- huC11.D5.3L1H3	9350-9383	12048-12081
BCMA	BCMA-huC13-F12	9384-9417	12082-12115
CD20	CD20-Ubli-v4	9656-9689	12354-12387
CD37	CD37-TRU-HL	9724-9757	12422-12455
CD70	CD70-1G2D	9792-9825	12490-12523
CD70	CD70-10B4	9826-9859	12524-12557
CD70	CD70-13D	9860-9893	12558-12591

CD70	CD70-16D	9894-9927	12592-12625
CD70	CD70-21D	9928-9961	12626-12659
CD70	CD70-24D	9962-9995	12660-12693
CD70	CD70-25D	9996-10029	12694-12727
CD70	CD70-69A7	10030-10063	12728-12761
CD70	CD70-hu-2H5	10064-10097	12762-12795
CD123	CD123-DART-1	10098-10131	12796-12829
CD123	CD123-DART-2	10132-10165	12830-12863
CD179a	CD179a-2460-B04	10166-10199	12864-12897
CD179a	CD179a-2462-E07	10200-10233	12898-12931
FITC	FITC-4M-53	10234-10267	12932-12965
FITC	FITC-E2	10268-10301	12966-12999
MPL	Hu-161-2	10302-10335	13000-13033
CD37	huCD37-Boeh	10336-10369	13034-13067
Легкая цепь каппа	Каппа-LC1	10438-10471	13136-13169
MPL	MPL-hu-111-2	10472-10505	13170-13203

[00177] ТАБЛИЦА 12 Иллюстративные конструкции CAR первого поколения коэкспрессирующие вспомогательные модули hNEMO-K277A и PAC. Оба вспомогательных модуля не являются обязательными.

Мишень	Название конструкций CAR, включая название антигенсвязывающего домена	SEQ ID NO (ДНК)	SEQ ID NO (БЕЛОК)
CD19	CD8SP-FMC63-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1594	5507
CD19	CD8SP-huFMC63-11-(vL-vH)-Myc-z-P2A-	1595	5508

	hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC		
CD19	CD8SP-huFMC63-11-N203Q-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1596	5509
CD19	CD8SP-CD19Bu12-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1597	5510
CD19	CD8SP-2-CD19MM-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1598	5511
CD19	CD8SP-CD19-4G7-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1599	5512
CD19	CD8SP-CD19-MEDI-3649-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1600	5513
CD19	CD8SP-CD19-Medrex-24D1-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1601	5514
CD19	CD8SP-Ritx-CD19-MOR0028-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1602	5515
CD19	CD8SP-CD19-HD37-H2L1-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1603	5516
CD19	CD8SP-CD19-huBly3-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1604	5517
CD19	CD8SP-CD19-huSJ25C1-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1605	5518
CD19	CD8SP-Ritx-CD19-hB4-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1606	5519
CD19	CD8SP-CD19-hu-mROO5-1-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1607	5520
CD19	CD8SP-CD19-hA19-(vL-vH)-Myc-z-P2A-	1608	5521

	hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC		
Комплекс AFP/МНС класса I	CD8SP-AFP-61-(vL-vH)-Myc-z-P2A- hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1609	5522
Комплекс AFP/МНС класса I	CD8SP-AFP-76-(vL-vH)-Myc-z-P2A- hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1610	5523
Комплекс AFP/МНС класса I	CD8SP-AFP-79-(vL-vH)-Myc-z-P2A- hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1611	5524
HIV-env гликопротеин	CD8SP-HIV1-N6-(vL-vH)-Myc-z-P2A- hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1612	5525
ALK	CD8SP-Alk-48-(vL-vH)-Myc-z-P2A- hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1613	5526
ALK	CD8SP-Alk-58-(vL-vH)-Myc-z-P2A- hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1614	5527
амилоид	SP-Amyloid-158-(vL-vH)-Myc-z-P2A- hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1615	5528
биотин	CD8SP-dc-Avidin-Myc-z-P2A-hNEMO- K277A-Flag-T2A-PAC	1616	5529
CD45	CD8SP-BC8-CD45-(vL-vH)-Myc-z-P2A- hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1617	5530
BCMA	CD8SP-BCMA-J6M0-(vL-vH)-Myc-z-P2A- hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1618	5531
BCMA	CD8SP-BCMA-huC12A3-L3H3-(vL-vH)- Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A- PAC	1619	5532
BCMA	CD8SP-BCMA-ET-40-(vL-vH)-Myc-z-P2A-	1620	5533

	hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC		
BCMA	CD8SP-BCMA-ET-54-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1621	5534
BCMA	CD8SP-BCMA-ET-03-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1622	5535
BCMA	CD8SP-BCMA-huC11.D5.3L1H3-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1623	5536
BCMA	CD8SP-BCMA-huC13-F12-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1624	5537
CCR4	CD8SP-CCR4-humAb1567-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1625	5538
HIV-env гликопротеин	CD8SP-CD4-ECD-Linker-DC-SIGN-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1626	5539
CD5	CD8SP-CD5-9-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1627	5540
CD5	CD8SP-CD5-18-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1628	5541
Ig Fc	CD8SP-CD16A-V158-ECD-v2-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1629	5542
Ig Fc	CD8SP-CD16A-V158-ECD-v1-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1630	5543
CD20	CD8SP-CD20-2F2-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1631	5544
CD20	CD8SP-CD20-GA101-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1632	5545
CD20	CD8SP-CD20-Leu16-(vL-vH)-Myc-z-P2A-	1633	5546

	hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC		
CD20	CD8SP-CD20-11B8-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1634	5547
CD20	CD8SP-CD20-2C6-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1635	5548
CD20	CD8SP-CD20-2H7-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1636	5549
CD20	CD8SP-CD20-hA20-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1637	5550
CD20	CD8SP-CD20-BM-CA-1925-v4-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1638	5551
CD20	CD8SP-CD20-Ubli-v4-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1639	5552
CD20	CD8SP-CD20-2H7-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1640	5553
CD20	CD8SP-CD20-h1F5-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1641	5554
CD20	CD8SP-CD20-7D8-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1642	5555
CD20	CD8SP-CD20-AME-33-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1643	5556
CD22	CD8SP-CD22-h10F4v2-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1644	5557
CD22	CD8SP-CD22-H22Rhov2ACDRKA-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1645	5558

CD22	CD8SP-CD22-m971-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1646	5559
CD22	CD8SP-CD22-m971-HL-(vH-vL)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1647	5560
CD30	CD8SP-CD30-5F11-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1648	5561
CD30	CD8SP-CD30-Ac10-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1649	5562
CD32	CD8SP-CD32-Med9-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1650	5563
CD33	CD8SP-CD33-AF5-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1651	5564
CD33	CD8SP-CD33-huMyc9-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1652	5565
CD33	CD8SP-CD33-Boehr2800308-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1653	5566
CD33	CD8SP-CD33-Him3-4-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1654	5567
CD33	CD8SP-CD33-SGNh2H12-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1655	5568
CD33	CD8SP-CD33-15G15-33-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1656	5569
CD33	CD8SP-CD33-33H4-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1657	5570
CD33	CD8SP-CD33-9C3-2-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1658	5571
CD34	CD8SP-CD34-hu4C7-(vL-vH)-Myc-z-P2A-	1659	5572

	hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC		
CD44v6	CD8SP-CD44v6-Biwa8-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1660	5573
CD70	CD8SP-CD70-h1F6-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1661	5574
CD79b	CD8SP-CD79b-2F2-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1662	5575
CD79b	CD8SP-huMA79bv28-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1663	5576
CD99	CD8SP-CD99-hu12E7-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1664	5577
CD123	CD8SP-CD123-CSL362-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1665	5578
CD123	CD8SP-CD123-1172-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1666	5579
CD123	CD8SP-CD123-DART-1-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1667	5580
CD123	CD8SP-CD123-DART-2-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1668	5581
CD123	CD8SP-CD123-I3RB18-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1669	5582
CD123	CD8SP-CD123-hu3E3-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1670	5583
CD123	CD8SP-CD123-9F6-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1671	5584
CD123	CD8SP-CD123-I3RB2-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1672	5585

CD123	CD8SP-CD123-1176-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1673	5586
CD123	CD8SP-Ritx2-CD123-8B11-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1674	5587
CD123	CD8SP-CD123-2B8-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1675	5588
CD123	CD8SP-CD123-9D7-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1676	5589
CD123	CD8SP-CD123-3B10-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1677	5590
CD138	CD8SP-CD138-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1678	5591
CD179b	CD8SP-CD179b-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1679	5592
CD276	CD8SP-CD276-17-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1680	5593
CD324	CD8SP-CD324-SC10-6-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1681	5594
CD324	CD8SP-CD324-hSC10-17-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1682	5595
CDH6	CD8SP-CDH6-NOV710-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1683	5596
CDH6	CD8SP-CDH6-NOV712-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1684	5597
CDH17	CD8SP-CDH17-PTA001A4-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1685	5598
CDH19	CD8SP-CDH19-16A4-(vL-vH)-Myc-z-P2A-	1686	5599

	hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC		
EGFR	CD8SP-Cetuximab-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1687	5600
CLEC5A	CD8SP-CLEC5A-8H8F5-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1688	5601
CLEC5A	CD8SP-CLEC5A-3E12A2-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1689	5602
GR/LHR (гонадотропиновый рецептор)	SP-CGHb-Linker-CGHa-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1690	5603
CLL1	CD8SP-CLL1-M26-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1691	5604
CLL1	CD8SP-CLL1-M32-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1692	5605
CLL1	CD8SP-CLL1-21C9-L2H3-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1693	5606
CLL1	CD8SP-CLL1-6E7L4H1e-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1694	5607
CLL1	CD8SP-CLL1-hu1075-v1-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1695	5608
CLL1	CD8SP-CLL1-hu1075-v2-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1696	5609
Комплекс CMVpp65/МНС класса I	CD8SP-CMVpp65-F5-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1697	5610
CS1 (SLAMF7)	CD8SP-CS1-huLuc63-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1698	5611

CS1 (SLAMF7)	CD8SP-CS1-HuLuc64-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1699	5612
CS1 (SLAMF7)	CD8SP-CS1-huLuc90-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1700	5613
CS1 (SLAMF7)	CD8SP-CS1-PDL241-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1701	5614
CS1 (SLAMF7)	CD8SP-CS1-Hu27A-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1702	5615
CS1 (SLAMF7)	CD8SP-CS1-ScHu34C3-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1703	5616
CS1 (SLAMF7)	CD8SP-CS1-Hu31-D2-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1704	5617
CS1 (SLAMF7)	CD8SP-CS1-Luc34-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1705	5618
CS1 (SLAMF7)	CD8SP-CS1-LucX2-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1706	5619
CSF2RA	CD8SP-CSF2RA-Ab6-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1707	5620
CSF2RA	CD8SP-CSF2RA-Ab1-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1708	5621
CXCR4 и CD123	CD8SP-CXCR4-1-vHH-Linker-CD123-1-vHH-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1709	5622
CXCR4 и CD123	CD8SP-CXCR4-2-VHH-Linker-CD123-2-VHH-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1710	5623
DLL3 (Дельта-подобный лиганд)	CD8SP-DLL3-hSC16-13-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1711	5624

3)			
DLL3	CD8SP-DLL3-hSC16-56-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1712	5625
Комплекс EBNA3c/MHC класса I	CD8SP-EBNA3c-315-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1713	5626
EBV-gp350	CD8SP-EBV-gp350-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1714	5627
EGFR	CD8SP-EGFR1-vHH-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1715	5628
EGFR & CEA	CD8SP-EGFR1-vHH-Linker-CEA1-vHH-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1716	5629
EGFR & CEA	CD8SP-EGFR33-vHH-Linker-CEA5-vHH-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1717	5630
EGFRvIII	CD8SP-EGFRvIII-139-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1718	5631
EGFRvIII	CD8SP-EGFRvIII-2173-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1719	5632
EpCam1	CD8SP-Epcam1-MM1-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1720	5633
EpCam1	CD8SP-Epcam1-D5K5-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1721	5634
FLT3	CD8SP-FLT3-NC7-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1722	5635
FITC	CD8SP-FITC-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1723	5636

FITC	CD8SP-FITC-4M-53-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1724	5637
FITC	CD8SP-FITC-E2-HL-(vH-vL)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1725	5638
Грипп А НА	CD8SP-FLU-MEDI-8852-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1726	5639
FR1 (фолатный рецептор альфа)	CD8SP-FR1-huMov19-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1727	5640
FSHR (рецептор фолликулостимулирующего гормона)	CD8SP-FSHb-Linker-CGHa-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1728	5641
Комплекс GAD (декарбоксилаза глутаминовой кислоты)/МНС класса I	CD8SP-GAD-G3H8-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1729	5642
GD2	CD8SP-GD2-hu14-18-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1730	5643
GD2	CD8SP-GD2-hu3F8-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1731	5644
GD3	CD8SP-GD3-KM-641-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1732	5645
GFRa4 (Рецептор Альфа 4 семейства GDNF)	CD8SP-GFRAlpha4-P4-6-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1733	5646
GFRa4	CD8SP-GFRa4-P4-10-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1734	5647
GM1	CD8SP-GM1-5B2-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1735	5648
GM1	CD8SP-GM1-7E5-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1736	5649

GPRC5D (член D группы 5 семейства C связанных с G-белком рецепторов)	CD8SP-GPRC5D-ET150-5-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1737	5650
GPRC5D	CD8SP-GPRC5D-ET150-18-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1738	5651
GPRC5D	CD8SP-GPRC5D-ET150-1-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1739	5652
GPRC5D	CD8SP-GPRC5D-ET150-2-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1740	5653
комплекс gp100/МНС класса I	CD8SP-gp100-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1741	5654
комплекс gp100/МНС класса I	CD8SP-gp100-G2D12-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1742	5655
GPC3 (Глипикан 3)	CD8SP-GPC3-4E5-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1743	5656
gpNMB (гликопротеин Nmb)	CD8SP-gpNMB-115-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1744	5657
GRP78	CD8SP-GRP78-GC18-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1745	5658
Her2	CD8SP-Her2-5F7-vHH-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1746	5659
Her2	IgHSP-Her2-Affi-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1747	5660
Her2	CD8SP-Her2-1-Darpin-Myc-z-P2A-	1748	5661

	hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC		
Her2	IgHSP-Her2-2-Darpin-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1749	5662
Her2	CD8SP-Her2-5F7-vHH-Linker-Her2-47D5-vHH-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1750	5663
Her2	CD8SP-Her2-Hu4D5-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1751	5664
HER3	CD8SP-Her3-17B05So-vHH-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1752	5665
HER3	CD8SP-Her3-Affi-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1753	5666
Her2 и Her3	CD8SP-Her3-17B05So-vHH-Linker-Her2-2D3-vHH-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1754	5667
Комплекс HIV1-gag/МНС класса I	CD8SP-HIV1-E5-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1755	5668
HIV-env гликопротеин	CD8SP-HIV1-3BNC117-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1756	5669
HIV-env гликопротеин	CD8SP-HIV1-PGT-128-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1757	5670
HIV-env гликопротеин	CD8SP-HIV1-VR-C01-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1758	5671
HIV-env гликопротеин	CD8SP-HIV1-X5-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1759	5672
HLA-A2	CD8SP-HLA-A2-3PB2-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1760	5673

HMW-MAA	CD8SP-HMW-MAA-hIND-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1761	5674
Комплекс HPV16-E7/МНС класса I	CD8SP-HPV16-7-8-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1762	5675
Комплекс HPV16-E7/МНС класса I	CD8SP-HPV16-2-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1763	5676
Комплекс HTLV1-TAX/МНС класса I	CD8SP-HTLV-TAX-T3F2-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1764	5677
Комплекс HTLV1-TAX/МНС класса I	CD8SP-HTLV-TAX-T3E3-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1765	5678
IL11Ra	CD8SP-IL11Ra-8E2-Ts107-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1766	5679
IL6Ra	IgHSP-IL6R-304-vHH-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1767	5680
IL13Ra2	CD8SP-IL13Ra2-hu107-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1768	5681
IL13Ra2	CD8SP-IL13Ra2-Hu108-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1769	5682
KSHV-K8.1	CD8SP-KSHV-4C3-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1770	5683
LAMP1 (лизосомально-ассоциированный)	CD8SP-LAMP1-humab1-2-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1771	5684

мембранный белок 1)			
LAMP1	CD8SP-LAMP1-Mb4-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1772	5685
LewisY	CD8SP-LewisY-huS193-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1773	5686
L1CAM	CD8SP-L1CAM-9-3-HU3-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1774	5687
LHR	SP-LHb-Linker-CGHa-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1775	5688
Lym1	CD8SP-Lym1-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1776	5689
Lym2	CD8SP-Lym2-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1777	5690
CD79b	CD8SP-huMA79bv28-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1778	5691
Комплекс MART1/MHC класса I	CD8SP-MART1-CAG10-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1779	5692
Комплекс MART1/MHC класса I	CD8SP-MART1-CLA12-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1780	5693
Мезотелин	CD8SP-Mesothelin-m912-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1781	5694
сMET	CD8SP-cMet-171-vHH-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1782	5695
сMet и Her3	CD8SP-cMET-171-vHH-Linker-Her3-21F06-vHH-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-	1783	5696

	Flag-T2A-PAC		
MPL	CD8SP-MPL-175-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1784	5697
MPL	CD8SP-MPL-161-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1785	5698
MPL	CD8SP-MPL-161-HL-(vH-vL)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1786	5699
MPL	CD8SP-2-MPL-111-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1787	5700
MPL	CD8SP-MPL-178-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1788	5701
MPL	CD8SP-MPL-AB317-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1789	5702
MPL	CD8SP-MPL-12E10-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1790	5703
MPL	CD8SP-MPL-huVB22Bw5-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1791	5704
Комплекс Muc1/MHC класса I	CD8SP-Muc1-D6-M3B8-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1792	5705
Комплекс Muc1/MHC класса I	CD8SP-MUC1-D6-M3A1-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1793	5706
Muc16	CD8SP-Muc16-4H11-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1794	5707
EGFR	CD8SP-Nimotuzumab-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1795	5708

NKG2D Лиганд	CD8SP-NKG2D-(GGGGS-GGGGD)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1796	5709
NKG2D	CD8SP-NKG2D-MS-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1797	5710
NY-BR1	CD8SP-NYBR1-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1798	5711
Комплекс NY-ESO/МНС класса I	CD8SP-NYESO-T1-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1799	5712
Комплекс NY-ESO/МНС класса I	CD8SP-NYESO-T1-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1800	5713
Лиганд PD1 (например, PDL1)	CD8SP-PD1-ECD-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1801	5714
PDL1	CD8SP-PDL1-Atezoli-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1802	5715
PDL1	CD8SP-PDL1-SP142-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1803	5716
PDL1	CD8SP-PDL1-10A5-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1804	5717
PSCA (антиген стволовых клеток простаты)	CD8SP-PSCA-Ha14-121-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1805	5718
PSCA (антиген стволовых клеток простаты)	CD8SP-PSCA-Ha14-117-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1806	5719
Комплекс PR1/МНС класса	CD8SP-PR1-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-	1807	5720

I	K277A-Flag-T2A-PAC		
PSMA (простатспецифический мембранный антиген)	CD8SP-PSMA-006-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1808	5721
PSMA	CD8SP-PSMA-J591-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1809	5722
PTK7 (тирозин-протеинкиназа подобная 7)	CD8SP-PTK7-hSC6-23-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1810	5723
PTK7	CD8SP-PTK7-SC6-10-2-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1811	5724
ROR1	CD8SP-ROR1-4A5-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1812	5725
ROR1	CD8SP-ROR1-4C10-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1813	5726
Мезотелин	CD8SP-SD1-vHH-Linker-SD2-vHH-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1814	5727
SLea	CD8SP-SLea-7E3-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1815	5728
SLea	CD8SP-SLea-5B1-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1816	5729
SSEA4 (cnflbwj cgtwbabxysq эмбриональный антиген 4)	CD8SP-SSEA4-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1817	5730
TCRb1 (константная	CD8SP-TCRB1-CP01-E09-(vL-vH)-Myc-z-	1818	5731

цепь TCR бета 1)	P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC		
TCRb1	CD8SP-TCRB1-Jovi1-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1819	5732
TCRb2 (константная цепь TCR бета 2)	CD8SP-TCRB2-CP01-D05-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1820	5733
TCRb2	CD8SP-TCRB2-CP01-E05-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1821	5734
TCRgd (TCR гамма/дельта)	CD8SP-TCRgd-G5-4-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1822	5735
комплекс hTERT/МНС класса I	CD8SP-TERT-4A9-T540-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1823	5736
комплекс hTERT/МНС класса I	CD8SP-TERT-3G3-T865-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1824	5737
Тканевый Фактор-1	CD8SP-TGFBR2-Ab1-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1825	5738
TGFBR2	CD8SP-TF1-98-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1826	5739
TIM1/HA VCR	CD8SP-TIM1-HVCR1-270-2-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1827	5740
TIM1/HA VCR	CD8SP-TIM1-HVCR1-ARD5-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1828	5741
TnAg	CD8SP-TnAg-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1829	5742
Tn-MUC1	CD8SP-TnMuc1-hu5E5-RHA8-RKA-2-(vL-	1830	5743

	vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC		
MPL	CD8SP-hTPO-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1831	5744
TROP2 (антиген-2 клеточной поверхности трофобласта)	CD8SP-TROP2-ARA47-HV3KV3-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1832	5745
TROP2	CD8SP-TROP2-h7E6-SVG-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1833	5746
TSHR	SP-TSHb-Linker-CGHa-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1834	5747
TSHR	CD8SP-TSHR-K1-70-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1835	5748
TSHR	CD8SP-TSHR-KB1-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1836	5749
TSHR	CD8SP-TSHR-5C9-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1837	5750
TSLPR (тимусный рецептор стромального лимфопоэтина)	CD8SP-TSLPR-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1838	5751
Комплекс тирозиназы/МНС класс I	CD8SP-Tyros-B2-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1839	5752
Комплекс тирозиназы/МНС класс I	CD8SP-Tyros-MC1-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1840	5753

Комплекс тирозиназы/МНС класс I	CD8SP-Tyros-TA2-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1841	5754
VEGFR3	CD8SP-VEGFR3-Ab1-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1842	5755
Комплекс WT1/МНС класса I	CD8SP-WT1-Ab1-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1843	5756
Комплекс WT1/МНС класса I	CD8SP-WT1-Ab5-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1844	5757
Комплекс WT1/МНС класса I	CD8SP-MYC3-WT1-Ab13-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1845	5758
Комплекс WT1/МНС класса I	CD8SP-MYC3-WT1-Ab15-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1846	5759
CDH19	CD8SP-CDH19-4B10-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1847	5760
Фолатный рецептор бета	CD8SP-FRbeta-m923-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1848	5761
LHR (рецептор лютеинизирующего гормона)	CD8SP-LHR-8B7-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1849	5762
LHR	CD8SP-LHR-5F4-21-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1850	5763
B7H4	CD8SP-B7H4-hu22C10-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1851	5764

B7H4	CD8SP-B7H4-hu1D11-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1852	5765
IgE	CD8SP-IgE-omalizumab-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1853	5766
CD23	CD8SP-CD23-p5E8-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1854	5767
GCC (гуанилилциклаза C)	CD8SP-GCC-5F9-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1855	5768
GCC	CD8SP-GCC-Ab229-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1856	5769
CD200R	CD8SP-CD200R-huDx182-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1857	5770
Tn-MUC1	CD8SP-Tn-Muc1-5E5-HL-(vH-vL)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1858	5771
CD22	CD8SP-CD22-5-HL-(vH-vL)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1859	5772
CD22	CD8SP-CD22-10-HL-(vH-vL)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1860	5773
CD22	CD8SP-CD22-31-HL-(vH-vL)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1861	5774
CD22	CD8SP-CD22-53-HL-(vH-vL)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1862	5775
CD22	CD8SP-CD22-65-HL-(vH-vL)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1863	5776
Tn-MUC1	CD8SP-Tn-Muc1-5E5-(vH-vL)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1864	5777

Легкая Каппа	цепь	CD8SP-Каппа-LC1-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1865	5778
PTK7		CD8SP-PTK7-7C8-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1866	5779
PTK7		CD8SP-PTK7-12C6a-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1867	5780
CD19		CD8SP-hCD19-EUK5-13-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1868	5781
Ras		CD8SP-Ras-Ab2-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1869	5782
Ras		CD8SP-Ras-Ab4-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1870	5783
Клодин 18.2		CD8SP-CLD18A2-43A11-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1871	5784
Клодин 18.2		CD8SP-CLD18A2-175D10-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1872	5785
CD43		CD8SP-CD43-huJL-1-257-10-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1873	5786
CD69L		CD8SP-CD69L-DREG200-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1874	5787
Комплекс ESO-1/МНС I	NY-	CD8SP-NYESO-35-15-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1875	5788
Pgp		CD8SP-Pgp-9F11-(vH-vL)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1876	5789
Стрептэг		CD8SP-Streptag-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1877	5790
MPL		CD8SP-MPL-Hu-161-2-(vL-vH)-Myc-z-	1878	5791

	P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC		
Pgp	CD8SP-Pgp-MRK16-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1879	5792
BCMA	CD8SP-BCMA-353-vHH-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1880	5793
BCMA	CD8SP-BCMA-917-vHH-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1881	5794
BCMA	CD8SP-BCMA-353-vHH-Linker-BCMA917-vHH-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1882	5795
CD38	CD8SP-CD38-717-vHH-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1883	5796
BCMA	CD8SP-BCMA-346-vHH-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1884	5797
CD38-BCM	CD8SP-CD38-717-vHH-Ecoil-BCMA-346-vHH-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1885	5798
BCMA	CD8SP-BCMA-348-vHH-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1886	5799
CD38	CD8SP-CD38-331-vHH-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1887	5800
BCMA-CD38	CD8SP-BCMA-vHH-348-Ecoil-CD38-331-vHH-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1888	5801
CD19	CD8SP-CD19-vHH-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1889	5802
CD20	CD8SP-CD20-vHH-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1890	5803

CD19	CD8SP-CD19-vHH-Linker-CD20-vHH-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1891	5804
BCMA	CD8SP-BCMA-948-vHH-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1892	5805
BCMA	CD8SP-BCMA-972-vHH-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1893	5806
BCMA	CD8SP-BCMA-948-vHH-PG4SP-BCMA-972-vHH-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1894	5807
BCMA	CD8SP-BCMA-948-vHH-PG4SP-BCMA-972-vHH-Ecoilx4-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1895	5808
MPL	CD8SP-MPL-hu-175-2-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1896	5809
MPL	CD8SP-MPL-hu-111-2-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1897	5810
CD179a	CD8SP-CD179a-2460-B04-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1898	5811
CD179a	CD8SP-CD179a-2462-E07-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1899	5812

[00178] ТАБЛИЦА 13. ИДЕНТИФИКАЦИЯ SEQ ID CAR/БИТЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИХ ДОМЕНОВ, ОПИСАННЫХ ДЛЯ zCAR-NEMO-K277A (ТАБЛИЦА 12), В КАЧЕСТВЕ ШАБЛОНА

АРХИТЕКТУРА	ПРИМЕР CAR/Биспецифическая ловушка Т-клеток	SEQ ID NO ДНК		SEQ ID NO БЕЛОК	
zCAR-NEMO-K277A	CD8SP-FMC63-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	1594-1857	1858-1899	5507-5770	5771-5812

zCAR-K13	CD8SP-FMC63-(vL-vH)- Myc-z-P2A-K13-Flag-T2A- PAC	1016-1285		4929- 5192	
BBz CAR	CD8SP-FMC63-(vL-vH)- Myc-BBz-T2A-PAC	1318-1581		5231- 5494	
CD3 ϵ -TFP- NEMO- K277A	CD8SP-FMC63-(vL-vH)- CD3 ϵ -ECDTMCP-opt2- P2A-hNEMO-K277A-Flag- T2A-PAC	1900-2163	2164- 2205	5813- 6076	6077- 6118
CD3 δ -TFP- NEMO- K277A	CD8SP-FMC63-(vL-vH)- CD3 δ -ECDTMCP-opt2- P2A-hNEMO-K277A-Flag- T2A-PAC	2206-2469	2470- 2511	6119- 6382	6383- 6424
CD3 γ -TFP- NEMO- K277A	CD8SP-FMC63-(vL-vH)- CD3 γ -ECDTMCP-opt2- P2A-hNEMO-K277A-Flag- T2A-PAC	2512-2775	2776- 2817	6425- 6688	6689- 6730
CD3 ζ -TFP- NEMO- K277A	CD8SP-FMC63-(vL-vH)- CD3 ζ -ECDTMCP-opt2- P2A-hNEMO-K277A-Flag- T2A-PAC	2818-3081	3082- 3123	6731- 6994	6995- 7036
Биспецифи- ческая ловушка Т- клеток	CD8SP-FMC63-scFv- Linker-CD3-scFv-Myc-His	3545-3814		7458- 7721	

[00179] ТАБЛИЦА 14: Аб-TCR КОНСТРУКЦИИ С РАЗЛИЧНЫМИ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИМИ ДОМЕНАМИ.

Мишень	Название конструкций CAR, включая название антигенсвязывающего домена	SEQ ID NO (ДНК)	SEQ ID NO (БЕЛОК)
--------	---	-----------------	-------------------

CD19	CD8SP-FMC63-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-FMC63-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3124	7037
CD19	CD8SP-huFMC63-11-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-huFMC63-11-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3125	7038
CD19	CD8SP-CD19Bu12-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD19Bu12-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3126	7039
CD19	CD8SP2-CD19MM-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD19MM-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3127	7040
CD19	CD8SP-CD19-4G7-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD19-4G7-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3128	7041
HIV1-env	CD8SP-HIV1-N6-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-HIV1-N6-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3129	7042
ALK	CD8SP-Alk-48-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-Alk-48-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3130	7043
ALK	CD8SP-Alk-58-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-Alk-58-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3131	7044
амилоид	SP-Amyloid-158-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-Amyloid-158-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3132	7045
биотин	CD8SP-dc-Avidin-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-dc-Avidin-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-	3133	7046

	F2A-hNEMO-K277A		
CD45	CD8SP-BC8-CD45-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-BC8-CD45-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3134	7047
BCMA	CD8SP-BCMA-J6M0-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-BCMA-J6M0-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3135	7048
BCMA	CD8SP-BCMA-huC12A3-L3H3-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-BCMA-huC12A3-L3H3-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3136	7049
BCMA	CD8SP-BCMA-ET-40-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-BCMA-ET-40-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3137	7050
BCMA	CD8SP-BCMA-ET-54-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-BCMA-ET-54-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3138	7051
CCR4	CD8SP-CCR4-humAb1567-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CCR4-humAb1567-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3139	7052
HIV1-env	CD8SP-CD4-ECD-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-DC-SIGN-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3140	7053
CD5	CD8SP-CD5-9-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD5-9-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3141	7054
CD5	CD8SP-CD5-18-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD5-18-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3142	7055

IgFc	CD8SP-CD16A-V158-ECD-v1-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-P2A-CD8SP2-CD16A-V158-ECD-v2-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3143	7056
IgFc	CD8SP-CD16A-V158-ECD-v1-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-P2A-SP-CD123-1-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3144	7057
CD20	CD8SP-CD20-2F2-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD20-2F2-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3145	7058
CD20	CD8SP-CD20-GA101-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD20-GA101-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3146	7059
CD22	CD8SP-CD22-h10F4v2-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD22-h10F4v2-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3147	7060
CD22	CD8SP-CD22-H22Rhov2ACDRKA-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD22-H22Rhov2ACDRKA-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3148	7061
CD22	CD8SP-CD22-m971-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD22-m971-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3149	7062
CD30	CD8SP-CD30-5F11-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD30-5F11-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3150	7063
CD30	CD8SP-CD30-Ac10-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD30-Ac10-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3151	7064
CD32	CD8SP-CD32-Med9-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD32-Med9-vH-[IgG1-CH1-TCRa-	3152	7065

	SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A		
CD33	CD8SP-CD33-AF5-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD33-AF5-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3153	7066
CD33	CD8SP-CD33-huMyc9-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD33-huMyc9-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3154	7067
CD34	CD8SP-CD34-hu4C7-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD34-hu4C7-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3155	7068
CD44v6	CD8SP-CD44v6-Biwa8-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD44v6-Biwa8-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3156	7069
CD70	CD8SP-CD70-h1F6-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD70-h1F6-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3157	7070
CD79b	CD8SP-CD79b-2F2-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD79b-2F2-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3158	7071
CD123	CD8SP-CD123-CSL362-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD123-CSL362-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3159	7072
CD138	CD8SP-CD138-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD138-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3160	7073
CD179b	CD8SP-CD179b-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD179b-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3161	7074

CD276	CD8SP-CD276-17-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD276-17-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3162	7075
CD324	CD8SP-CD324-SC10-6-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD324-SC10-6-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3163	7076
CD324	CD8SP-CD324-hSC10-17-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD324-hSC10-17-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3164	7077
CDH6	CD8SP-CDH6-NOV710-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CDH6-NOV710-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3165	7078
CDH6	CD8SP-CDH6-NOV712-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CDH6-NOV712-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3166	7079
CDH17	CD8SP-CDH17-PTA001A4-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CDH17-PTA001A4-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3167	7080
CDH19	CD8SP-CDH19-16A4-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CDH19-16A4-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3168	7081
EGFR	CD8SP-Cetuximab-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-Cetuximab-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3169	7082
CLEC5A	CD8SP-CLEC5A-8H8F5-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CLEC5A-8H8F5-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3170	7083
CLEC5A	CD8SP-CLEC5A-3E12A2-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CLEC5A-3E12A2-vH-[IgG1-	3171	7084

	CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A		
GR/LHR	SP-CGHb-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CGHa-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3172	7085
CLL1	CD8SP-CLL1-M26-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CLL1-M26-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3173	7086
CLL1	CD8SP-CLL1-M32-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CLL1-M32-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3174	7087
CMVpp65	CD8SP-CMVpp65-F5-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CMVpp65-F5-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3175	7088
CS1	CD8SP-CS1-huLuc63-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-huLuc63-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3176	7089
CS1	CD8SP-HuLuc64-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-HuLuc64-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3177	7090
CS1	CD8SP-CS1-huLuc90-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-huLuc90-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3178	7091
CSF2RA	CD8SP-CSF2RA-Ab6-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CSF2RA-Ab6-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3179	7092
CSF2RA	CD8SP-CSF2RA-Ab1-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CSF2RA-Ab1-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3180	7093

CD123	IgHSP-CD123-2-vHH-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD123-1-vHH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3181	7094
CD123 и IgFc	IgHSP-CD123-2-vHH-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-CD8SP1-CD16A-V158-ECD-v1-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3182	7095
CD123 и IgFc	IgHSP-CD123-2-vHH-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-CD8SP2-CD16A-V158-ECD-v2-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3183	7096
CD123 и MPL	IgHSP-CD123-2-vHH-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-CD8SP-MPL-161-HL-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3184	7097
CXCR4 & CD123	CD8SP-CXCR4-1-vHH-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD123-1-vHH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3185	7098
CXCR4 & CD123	CD8SP-CXCR4-2-VHH-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD123-2-VHH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3186	7099
DLL3	CD8SP-DLL3-hSC16-13-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-DLL3-hSC16-13-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3187	7100
DLL3	CD8SP-DLL3-hSC16-56-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-DLL3-hSC16-56-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3188	7101
EBNA3c	CD8SP-EBNA3c-315-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-EBNA3c-315-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3189	7102
EBV-gp350	CD8SP-EBV-gp350-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-EBV-gp350-vH-[IgG1-CH1-TCRa-	3190	7103

	SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A		
EGFR	CD8SP-EGFR1-vHH-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CEA1-vHH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3191	7104
EGFR	CD8SP-EGFR33-vHH-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CEA5-vHH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3192	7105
EGFRvIII	CD8SP-EGFRvIII-139-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-EGFRvIII-139-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3193	7106
EGFRvIII	CD8SP-EGFRvIII-2173-vH-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-EGFRvIII-2173-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3194	7107
EpCam1	CD8SP-Epcam1-MM1-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-Epcam1-MM1-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3195	7108
EpCam1	CD8SP-Epcam1-D5K5-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-Epcam1-D5K5-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3196	7109
FLT3	CD8SP-FLT3-NC7-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-FLT3-NC7-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3197	7110
FITC	CD8SP-FITC-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-FITC-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3198	7111
Грипп А НА	CD8SP-FLU-MEDI-8852-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-FLU-MEDI-8852-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3199	7112

Фолатный рецептор 1	CD8SP-FR1-huMov19-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-FR1-huMov19-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3200	7113
FSHR	CD8SP-FSHb-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CGHa-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3201	7114
GD2	CD8SP-GD2-hu14-18-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-GD2-hu14-18-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3202	7115
GD2	CD8SP-GD2-hu3F8-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-GD2-hu3F8-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3203	7116
GD3	CD8SP-GD3-KM-641-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-GD3-KM-641-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3204	7117
GFRa4	CD8SP-GFRAlpha4-P4-6-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-GFRAlpha4-P4-6-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3205	7118
GFRa4	CD8SP-GFRa4-P4-10-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-GFRa4-P4-10-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3206	7119
Фукозил-GM1	CD8SP-GM1-5B2-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-GM1-5B2-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3207	7120
Фукозил-GM1	CD8SP-GM1-7E5-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-GM1-7E5-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3208	7121
GPRC5D	CD8SP-GPRC5D-ET150-5-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-GPRC5D-ET150-5-vH-[IgG1-	3209	7122

	CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A		
GPRC5D	CD8SP-GPRC5D-ET150-18-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-GPRC5D-ET150-18-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3210	7123
gp100	CD8SP-gp100-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-gp100-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3211	7124
gp100	CD8SP-gp100-G2D12-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-gp100-G2D12-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3212	7125
GPC3	CD8SP-GPC3-4E5-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-GPC3-4E5-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3213	7126
gpNMB	CD8SP-gpNMB-115-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-gpNMB-115-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3214	7127
GRP78	CD8SP-GRP78-GC18-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-GRP78-GC18-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3215	7128
Her2	CD8SP-Her2-1-Darpin-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-Her2-2-Darpin-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3216	7129
Her2	CD8SP-Her2-5F7-vHH-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-Her2-47D5-vHH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3217	7130
Her2	CD8SP-Her2-Hu4D5-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-Her2-Hu4D5-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3218	7131

Her2 & Her3	CD8SP-Her3-17B05So-vHH-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-Her2-2D3-vHH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3219	7132
HIV1-gag	CD8SP-HIV1-E5-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-HIV1-E5-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3220	7133
HIV1-env	CD8SP-HIV1-3BNC117-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-HIV1-3BNC117-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3221	7134
HIV1-env	CD8SP-HIV1-PGT-128-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3222	7135
HIV1-env	CD8SP-HIV1-VR-C01-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-HIV1-VR-C01-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3223	7136
HIV1-env	CD8SP-HIV1-X5-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-HIV1-X5-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3224	7137
HMW- MAA	CD8SP-HMW-MAA-hIND-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-HMW-MAA-hIND-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3225	7138
HTLV1- TAX	CD8SP-HTLV-TAX-T3F2-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-TAX-T3F2-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3226	7139
HTLV1- TAX	CD8SP-HTLV-TAX-T3E3-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-TAX-T3E3-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3227	7140
IL11Ra	CD8SP-IL11Ra-8E2-Ts107-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-IL11Ra-8E2-Ts107-vH-[IgG1-	3228	7141

	CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A		
IL6Ra & CD19	IgHSP-IL6R-304-vHH-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-FMC63-scFV-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3229	7142
IL13Ra2	CD8SP-IL13Ra2-hu107-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-IL13Ra2-hu107vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3230	7143
IL13Ra2	CD8SP-IL13Ra2-Hu108-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-IL13Ra2-Hu108-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3231	7144
KSHV-K8.1	CD8SP-KSHV-4C3-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-4C3-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3232	7145
LAMP1	CD8SP-LAMP1-humab1-2-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-LAMP1-humab1-2vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3233	7146
LAMP1	CD8SP-LAMP1-Mb4-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-LAMP1-Mb4-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3234	7147
LewisY	CD8SP-LewisY-huS193-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-LewisY-huS193-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3235	7148
L1CAM	CD8SP-L1CAM-9-3-HU3-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-L1CAM-9-3-HU3-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3236	7149
LHR	SP-LHb-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CGHa-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3237	7150

Lym1	CD8SP-Lym1-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-Lym1-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3238	7151
Lym2	CD8SP-Lym2-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-Lym2-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3239	7152
CD79B	CD8SP-huMA79bv28-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-huMA79bv28-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3240	7153
MART1	CD8SP-MART1-CAG10-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-MART1-CAG10-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3241	7154
MART1	CD8SP-MART1-CLA12-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-MART1-CLA12-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3242	7155
Мезотелин	CD8SP-Mesothelin-m912-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-m912-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3243	7156
cMET	CD8SP-cMET-171-vHH-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-Her3-21F06-vHH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3244	7157
MPL	CD8SP-MPL-175-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-175-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3245	7158
MPL	CD8SP-MPL-161-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-161-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3246	7159
MPL	CD8SP2-MPL-111-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-MPL-111-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-	3247	7160

	6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A		
MPL	CD8SP-MPL-178-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-178-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3248	7161
MPL	CD8SP-MPL-AB317-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-AB317-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3249	7162
MPL	CD8SP-MPL-12E10-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-12E10-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3250	7163
MPL	CD8SP-MPL-huVB22Bw5-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-MPL-huVB22Bw5-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3251	7164
MUC1	CD8SP-Muc1-D6-M3B8-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-Muc1-D6-M3B8-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3252	7165
MUC1	CD8SP-MUC1-D6-M3A1-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-MUC1-D6-M3A1-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3253	7166
Muc16	CD8SP-Muc16-4H11-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-Muc16-4H11-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3254	7167
EGFR	CD8SP-Nimotuzumab-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-Nimotuzumab-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3255	7168
NKG2D	CD8SP-NKG2D-(G4SG4D)-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-NKG2D-(G4SG4D)-v2-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3256	7169

NKG2D	CD8SP-NKG2D-MS-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]- F-P2A-SP-NKG2D-MS-vH-[IgG1-CH1-TCRa- SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3257	7170
NYBR1	CD8SP-NYBR1-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F- P2A-SP-NYBR1-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP- 6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3258	7171
NY-ESO	CD8SP-NYESO-T1-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F- P2A-SP-NYESO-T1-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP- 6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3259	7172
NY-ESO	CD8SP-NYESO-T1-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F- P2A-SP-NYESO-T2-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP- 6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3260	7173
PD1 лиганд	SP-PD1-ECD-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-P2A-SP- PD1-opt-ECD-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F- F2A-hNEMO-K277A	3261	7174
PDL1	CD8SP-PDL1-Atezoli-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]- F-P2A-SP-PDL1-Atezoli-vH-[IgG1-CH1-TCRa- SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3262	7175
PDL1	CD8SP-PDL1-SP142-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]- F-P2A-SP-PDL1-SP142-vH-[IgG1-CH1-TCRa- SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3263	7176
PDL1	CD8SP-PDL1-10A5-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]- F-P2A-SP-PDL1-10A5-vH-[IgG1-CH1-TCRa- SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3264	7177
PSCA	CD8SP-PSCA-Ha14-121-vL-[IgCL-TCRb-IAH- 6MD]-F-P2A-SP-PSCA-Ha14-121-vH-[IgG1-CH1- TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3265	7178
PSCA	CD8SP-PSCA-Ha14-117-vL-[IgCL-TCRb-IAH- 6MD]-F-P2A-SP-PSCA-Ha14-117-vH-[IgG1-CH1-	3266	7179

	TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A		
PR1	CD8SP-PR1-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-PR1-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3267	7180
PSMA	CD8SP-PSMA-006-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-PSMA-006-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3268	7181
PSMA	CD8SP-PSMA-J591-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-PSMA-J591-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3269	7182
PTK7	CD8SP-PTK7-hSC6-23-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-PTK7-hSC6-23-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3270	7183
PTK7	CD8SP-PTK7-SC6-10-2-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-PTK7-SC6-10-2-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3271	7184
ROR1	CD8SP-ROR1-4A5-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-ROR1-4A5-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3272	7185
ROR1	CD8SP-ROR1-4C10-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-ROR1-4C10-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3273	7186
Мезотели н	CD8SP-SD1-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-SD2-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3274	7187
SLea	CD8SP-SLea-7E3-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-SLea-7E3-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3275	7188

SLea	CD8SP-SLea-5B1-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-SLea-5B1-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3276	7189
SSEA4	CD8SP-SSEA4-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-SSEA4-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3277	7190
Тирозина 3а	CD8SP-TA2-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-TA2-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3278	7191
TCRb1	CD8SP-TCRB1-CP01-E09-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-TCRB1-CP01-E09-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3279	7192
TCRb1	CD8SP-TCRB1-Jovi1-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-TCRB1-Jovi1-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3280	7193
TCRb2	CD8SP-TCRB2-CP01-D05-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-TCRB2-CP01-D05-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3281	7194
TCRb2	CD8SP-TCRB2-CP01-E05-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-TCRB2-CP01-E05-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3282	7195
TCRgd	CD8SP-TCRgd-G5-4-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-TCRgd-G5-4-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3283	7196
hTERT	CD8SP-TERT-4A9-T540-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-TERT-4A9-T540-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3284	7197
hTERT	CD8SP-TERT-3G3-T865-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-TERT-3G3-T865-vH-[IgG1-CH1-	3285	7198

	TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A		
TGFBR2	CD8SP-TGFBR2-Ab1-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-TGFBR2-Ab1-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3286	7199
TIM1	CD8SP-TIM1-HVCR1-270-2-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-TIM1-HVCR1-270-2-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3287	7200
TIM1	CD8SP-TIM1-HVCR1-ARD5-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-TIM1-HVCR1-ARD5vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3288	7201
TnAg	CD8SP-TnAg-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-TnAg-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3289	7202
Tn-MUC1	CD8SP-TnMuc1-hu5E5-RHA8-RKA-2-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-TnMuc1-hu5E5-RHA8-RKA-2vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3290	7203
TROP2	CD8SP-TROP2-ARA47-HV3KV3-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-TROP2-ARA47-HV3KV3-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3291	7204
TROP2	CD8SP-TROP2-h7E6-SVG-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-TROP2-h7E6-SVG-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3292	7205
TSHR	SP-TSHb-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CGHa-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3293	7206

TSHR	CD8SP-TSHR-K1-70-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-TSHR-K1-70-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3294	7207
TSHR	CD8SP-TSHR-KB1-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-TSHR-KB1-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3295	7208
TSHR	CD8SP-TSHR-5C9-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-TSHR-5C9-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3296	7209
TSLPR	CD8SP-TSLPR-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-TSLPR-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3297	7210
Тирозина за	CD8SP-Tyros-B2-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-Tyros-B2-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3298	7211
Тирозина за	CD8SP-Tyros-MC1-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-Tyros-MC1-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3299	7212
Тирозина за	CD8SP-Tyrosinase-B2-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-Tyrosinase-B2-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3300	7213
VEGFR3	CD8SP-VEGFR3-Ab1-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-VEGFR3-Ab1-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3301	7214
WT1	CD8SP-WT1-Ab1-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-WT1-Ab1-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3302	7215
WT1	CD8SP-WT1-Ab5-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-WT1-Ab5-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-	3303	7216

	6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A		
WT1	CD8SP-MYC3-WT1-Ab13-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-WT1-Ab13-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3304	7217
WT1	CD8SP-MYC3-WT1-Ab15-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-WT1-Ab15-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3305	7218
CD123	CD8SP-CD123-1172-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD123-1172-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3306	7219
CDH19	CD8SP-CDH19-4B10-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CDH19-4B10-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3307	7220
Фолатный рецептор бета	CD8SP-FRbeta-m923-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-FRbeta-m923-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3308	7221
LHR	CD8SP-LHR-8B7-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-LHR-8B7-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3309	7222
LHR	CD8SP-LHR-5F4-21-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-LHR-5F4-21-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3310	7223
B7H4	CD8SP-B7H4-hu22C10-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-B7H4-hu22C10-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3311	7224
B7H4	CD8SP-B7H4-hu1D11-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-B7H4-hu1D11-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3312	7225

IgE	CD8SP-IgE-omalizumab-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-IgE-omalizumab-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3313	7226
CD23	CD8SP-CD23-p5E8-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD23-p5E8-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3314	7227
GCC	CD8SP-GCC-5F9-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-GCC-5F9-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3315	7228
GCC	CD8SP-GCC-Ab229-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-GCC-Ab229-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3316	7229
CD200R	CD8SP-CD200R-huDx182-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD200R-huDx182-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3317	7230
Tn-MUC1	CD8SP-Tn-Muc1-5E5-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-Tn-Muc1-5E5-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3318	7231
CD22	CD8SP-CD22-5-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD22-5-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3319	7232
CD22	CD8SP-CD22-10-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD22-10-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3320	7233
CD22	CD8SP-CD22-31-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD22-31-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	3321	7234
CD22	CD8SP-CD22-53-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-CD22-53-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-	3322	7235

	6MDJ-F-F2A-hNEMO-K277A		
CD22	CD8SP-CD22-65-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MDJ]-F-P2A-SP-CD22-65-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MDJ]-F-F2A-hNEMO-K277A	3323	7236

[00180] В некоторых вариантах осуществления указанные композиции содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие обычные CAR 1-6 (**Таблица 1**), отличающиеся тем, что антигенспецифический домен CAR нацелен на один или более специфических антигенов, как описано в **Таблицах 6А-С** или Таблицах 5-6 в PCT/US2017/064379, которые включены в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления указанная композиция содержит нуклеиновые кислоты, кодирующие любые один или более остовы 1-72 (**Таблица 2**), при этом антигенспецифический домен закодированных CAR нацелен на один или более специфических антигенов, как описано в **Таблицах 6А-С** или Таблицах 5-6 в PCT/US2017/064379. В некоторых вариантах осуществления указанные композиции содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие остов-1, при этом антигенспецифический домен CAR в остове-1 нацелен на один или большее количество специфических для рака антигенов, как описано в данном документе в **Таблицах 6А-С** или Таблицах 5-6 PCT/US2017/064379. В некоторых вариантах осуществления указанные композиции содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие остов-1, при этом антигенспецифический домен CAR в остове-2 нацелен на один или большее количество специфических для рака антигенов, как описано в данном документе в **Таблицах 6А-С** или Таблицах 5-6 PCT/US2017/064379. В некоторых вариантах осуществления указанные композиции содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие остов-1, при этом антигенспецифический домен CAR в остове-37 нацелен на один или большее количество специфических для рака антигенов, как описано в данном документе в **Таблицах 6А-С** или Таблицах 5-6 PCT/US2017/064379. В некоторых вариантах осуществления указанные композиции содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие остов-1, при этом антигенспецифический домен CAR в остове-38 нацелен на один или большее количество специфических для рака антигенов, как описано в данном документе в **Таблицах 6А-С** или Таблицах 5-6 PCT/US2017/064379. В некоторых вариантах осуществления указанные композиции содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие остов-1, при этом антигенспецифический домен CAR в остове-49 нацелен на один или большее количество специфических для рака антигенов, как описано в данном документе в **Таблицах 6А-С** или Таблицах 5-6 PCT/US2017/064379. В некоторых вариантах осуществления указанные композиции содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие остов-1, при этом антигенспецифический домен CAR в остове-50 нацелен на один или большее количество специфических для рака антигенов, как описано в данном документе в **Таблицах 6А-С** или Таблицах 5-6 PCT/US2017/064379.

[00181] В различных вариантах осуществления выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие не встречающийся в природе иммунный рецептор, например CAR, компоненты остовов, описанных в данном документе, кодируют один, два, три или более антигенспецифических доменов. Например, можно использовать один или большее количество ASD, которые специфически связываются с антигеном, ассоциированным с раком, как описано в данном документе. Последовательности ASD являются смежными и находятся в той же рамке считывания, что и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей остатки одной или нескольких цепей CAR.

[00182] В одном варианте осуществления каждая антигенспецифическая область содержит полноразмерную тяжелую цепь IgG (специфичную для антигена-мишени), имеющую домены V_H , CH1, шарнирный и CH2 и CH3 (Fc) Ig, если только домен V_H является достаточным для придания антигенспецифичности («однодоменные антитела»). Тяжелая цепь IgG полной длины может быть связана с костимуляторным доменом и необязательным внутриклеточным сигнальным доменом через соответствующий трансмембранный домен. Если оба, домена V_H и V_L , необходимы для создания полностью активной антиген-специфической нацеливающей области, V_H -содержащий не встречающийся в природе иммунный рецептор, например, CAR, и полноразмерная лямбда-легкая цепь (IgL) вместе вводятся в клетки для генерации активной антигенспецифической области нацеливания.

[00183] В некоторых вариантах осуществления антигенспецифический домен кодируемого не встречающегося в природе иммунного рецептора, например, молекулы CAR, содержит антитело, фрагмент антитела, scFv, Fv, Fab, (Fab')₂, однодоменное антитело (SDAB), домен vH или vL или домен верблюдовых vHH . В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен не встречающегося в природе иммунного рецептора, например, CAR, представляет собой фрагмент антитела scFv, который гуманизован по сравнению с мышьиной последовательностью scFv, из которой он получен.

[00184] В некоторых случаях scFv могут быть получены в соответствии со способами, известными в данной области (например, Bird et al., (1988) Science 242: 423-426 и Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). Молекулы ScFv могут быть получены путем связывания областей V_H и V_L вместе с использованием гибких полипептидных линкеров. Молекулы scFv содержат линкер (например, линкер Ser-Gly) с оптимизированной длиной и/или аминокислотным составом (например, для оптимизации свертывания и т. д.). ScFv может содержать линкер из 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 более аминокислотных остатков между его V_L и V_H областями. В некоторых вариантах осуществления линкерная последовательность содержит аминокислоты глицин и серин. В другом варианте осуществления линкерная последовательность содержит наборы глициновых и сериновых повторов. Изменения в длине линкера могут сохранять или усиливать активность, что приводит к повышению эффективности в исследованиях активности. В некоторых

вариантах осуществления антигенспецифичные фрагменты антител scFv являются функциональными в том отношении, что они связывают тот же антиген с той же или сопоставимой аффинностью, что и антитело IgG, из которого оно получено. В других вариантах осуществления фрагмент антитела имеет более низкую аффинность связывания с антигеном по сравнению с антителом, из которого он получен, но является функциональным в том смысле, что он обеспечивает биологический ответ, описанный в данном документе. В одном варианте осуществления молекула CAR содержит фрагмент антитела, который имеет аффинность связывания KD от 10^{-4} М до 10^{-8} М, от 10^{-5} М до 10^{-7} М, 10^{-6} М или 10^{-8} М с целевым антигеном.

[00185] В одном варианте осуществления антигенспецифический домен содержит одну, две или все три CDR тяжелой цепи (hc), hcCDR1, hcCDR2 и hcCDR3 антитела или scFv, перечисленных в этом документе (**Таблица 6B**; SEQ ID NO: 14122-15039), и/или один, два или все три CDR легкой цепи (lc), lcCDR1, lcCDR2 и lcCDR3 антитела или scFv, перечисленные в данном документе (**Таблицы 6A**; SEQ ID NO: 13204-14121) (также см. **Таблицы 5-6 PCT/US2017/064379**). В некоторых вариантах осуществления ASD содержит фрагмент V_L (или vL), содержащий все три CDR легкой цепи, принадлежащие конкретному scFv (**Таблицы 6A**; SEQ ID NO: 13204-14121), или фрагмент V_H (или vH), содержащий все три CDR тяжелой цепи, принадлежащие конкретному scFv (**Таблица 6B**; SEQ ID NO: 14122-15039) (см. также **Таблицы 5-6 PCT/US2017/064379**). В **Таблице 6C** приведены названия, антигены-мишени и SEQ ID NO разных scFv, чьи фрагменты vL и vH и CDR перечислены в **Таблицах 6A и 6B**. Фрагменты vL и vH и соответствующие scFv могут использоваться в различных вариантах осуществления данного изобретения для конструирования CAR, описанных в данном документе.

[00186] В другом варианте осуществления антигенспецифический домен содержит гуманизованное антитело или фрагмент антитела. В некоторых аспектах антитело, не относящееся к человеку, является гуманизованным, где специфические последовательности или участки антитела модифицированы для увеличения сходства с антителом, естественно продуцируемым у человека или его фрагмента. В одном аспекте антигенсвязывающий домен является гуманизованным. Гуманизованное антитело может быть получено с использованием различных методов, известных в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, прививку CDR, облицовку или шлифовку и перетасовку цепи.

[00187] В дополнительном варианте осуществления каждый антигенспецифический домен не встречающегося в природе иммунного рецептора, например, CAR, может содержать двухвалентный (или бивалентный) одноцепочечный переменный фрагмент (di-scFvs, bi-scFvs). Например, в CAR, содержащих di-scFv, два scFv, специфичные для каждого антигена, связаны друг с другом путем образования одной пептидной цепи с двумя областями V_H и двумя V_L , в результате чего образуются тандемные scFv (Xiong, Cheng- Yi; Natarajan, A; Shi, XB; Denardo, GL; Denardo, SJ (2006). "Development of tumor targeting anti-MUC-1 multimer: effects of di-scFv unpaired cysteine

location on PEGylation and tumor binding". Protein Engineering Design and Selection 19 (8): 359-367; Kufer, Peter; Lutterbuse, Ralf; Baeuerle, Patrick A. (2004). "A revival of bispecific antibodies". Trends in Biotechnology 22 (5): 238-244). CAR, содержащие по меньшей мере, две антиген-специфические области нацеливания, будут экспрессировать два scFv, специфичные для каждого из двух антигенов. Полученный ASD присоединяется к костимуляторному домену и внутриклеточному сигнальному домену через шарнирную область и трансмембранный домен. Альтернативно, не встречающийся в природе иммунный рецептор, например, CAR, содержащий две области, специфичные к антигену, может экспрессировать два vHH, специфичных для каждого из двух антигенов или двух эпитопов одного и того же антигена. Иллюстративные CAR, нацеленные на два антигена, представлены SEQ ID NO: 1307 и 1310.

[00188] В другом варианте осуществления каждый ASD не встречающегося в природе иммунного рецептора, например CAR, содержит диатело. В диателе scFv создаются с линкерными пептидами, которые слишком коротки для того, чтобы две переменные области складывались вместе, заставляя scFv димеризоваться. Еще более короткие линкеры (одна или две аминокислоты) приводят к образованию тримеров, так называемых триател или трител. Также могут быть применены тетратела.

[00189] В некоторых вариантах осуществления ASD из не встречающийся в природе иммунного рецептора, например, CAR, содержит vHH фрагменты (нанотело), как описано в данном описании (смотрите, Таблицы 5-6 PCT/US2017/064379). В некоторых вариантах осуществления ASD из не встречающийся в природе иммунного рецептора, например, CAR, содержит аффитело, как описано в данном документе (см, Таблицы 5-6 PCT/US2017/064379).

[00190] В другом варианте осуществления антигенспецифический связывающий домен содержит лиганд для когнатной молекулы, экспрессируемой в клетке-мишени.

[00191] В одном варианте осуществления антигенспецифический домен не встречающегося в природе иммунного рецептора, например, CAR, против целевого антигена представляет собой антигенсвязывающую часть, *например*, CDR, фрагментов vHH, нацеленных на этот антиген (см. Таблицы 5-6 PCT/US2017/064379).

[00192] В одном варианте осуществления антигенспецифический домен не встречающегося в природе иммунного рецептора, например, CAR, против целевого антигена представляет собой антигенсвязывающую часть неиммуноглобулинового каркаса, нацеленного на этот антиген (см. Таблицы 5-6 из PCT/US2017/064379).

[00193] В одном варианте осуществления антигенспецифический домен, не встречающегося в природе иммунного рецептора, например, CAR, против антигена - мишени представляет собой антиген - связывающий участок рецептора, который как известно связывает этот антиген-мишень (см, Таблицы 5-6 PCT/US2017/064379).

[00194] В другом аспекте антигенсвязывающий домен представляет собой Т-клеточный рецептор («TCR») или его фрагмент, например, одноцепочечный TCR (scTCR). Способы изготовления таких TCR известны в данной области. См., *например*, Willemsen

RA et al., *Gene Therapy* 7: 1369-1377 (2000); Zhang T et al., *Cancer Gene Ther* 11: 487-496 (2004); Aggen et al., *Gene Ther.* 19 (4): 365-74 (2012) (ссылки включены в данное описание полностью). Например, может быть сконструирован scTCR, который содержит гены V α и V β из клона Т-клеток, связанных линкером (*например*, гибким пептидом). Этот подход очень полезен для ассоциированной с раком мишени, которая сама является внутриклеточной, однако фрагмент такого антигена (пептида) представлен на поверхности раковых клеток МНС.

[00195] В некоторых вариантах осуществления антигенспецифический домен представляет собой Т-клеточный рецептор, специфичный к антигену-мишени, или фрагмент Т-клеточного рецептора, где фрагмент сохраняет специфичность к антигену-мишени.

[00196] В некоторых вариантах осуществления антигенспецифический домен не встречающегося в природе иммунного рецептора, например, CAR, описанный в данном документе, связывается с представленным МНС пептидом. Обычно пептиды, полученные из эндогенных белков, заполняют карманы молекул класса I главного комплекса гистосовместимости (МНС) и распознаются Т-клеточными рецепторами (TCR) на CD8+ Т-лимфоцитах. Комплексы МНС класса I конститутивно экспрессируются всеми ядерными клетками. При раке комплексы вируса и/или опухоли-специфического пептида/МНС представляют собой уникальный класс мишеней на клеточной поверхности для иммунотерапии. TCR-подобные антитела, нацеленные на пептиды, полученные из вирусных или опухолевых антигенов в контексте человеческого антигена лейкоцитов (HLA)-A1 или HLA-A2, были описаны (см., *например*, Sastry et al, *J Viral.* 2011 85(5): 1935-1942; Sergeeva et al., *Blood*, 2011 117(16):4262-4272; Verma et al., *J Immunol* 2010 184(4):2156-2165; Willemsen et al, *Gene Ther* 20018(21) : 1601-1608; Dao et al, *Sci Transl Med* 2013 5(176) : 176ra33; Tassev et al, *Cancer Gene Ther* 2012 19(2):84-100. Например, TCR-подобное антитело может быть идентифицировано по скринингу библиотеки, такой как библиотека, отображаемая фагом scFv человека. Иллюстративные CAR, основанные на TCR-подобных антителах, нацеленных на WT1 в ассоциации с HLA-A2, представлены от SEQ ID NO: 1266 до SEQ ID NO: 1268. В настоящем изобретении CAR генерировали с использованием антигенсвязывающего домена, полученного из TCR-подобных антител против нескольких рестрикционных внутриклеточных пептидов HLA-A2. Белки-антигены-мишени, пептидный фрагмент и последовательность пептида продемонстрированы в **Таблице 8**.

[00197] В некоторых вариантах осуществления антигены, специфичные для заболевания, на которое может быть нацелен не встречающийся в природе иммунный рецептор, например, CAR, при экспрессии отдельно или с помощью дополнительных модулей, как описано в данном документе, включают, но не ограничиваются этим, один или большее количество из группы состоящей из CD5; CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS1 (также называется как подгруппа 1 CD2, CRACC, MPL, SLAMF7, CD319 и 19A24); лектиноподобной молекулы 1 С-типа (CLL-1 или CLECL1); CD33; рецептора

эпидермального фактора роста, вариант III (EGFRviii); ганглиозида G2 (GD2); ганглиозида GD3 (aNeu5Ac (2-8), aNeu5Ac (2-3) bDGalp (1-4) bDGlcр (1-1) Cer); белка созревания В-клеток члена семейства рецепторов TNF (BCMA); антигена Tn ((Tn Ag) или (GalNAc α -Ser/Thr)); простат-специфического мембранного антигена (PSMA); рецепторного тирозинкиназоподобного орфанного рецептора 1 (ROR1); Fms подобной тирозинкиназы 3 (FLT3); связанного с опухолью гликопротеина 72 (TAG72); CD38; CD44v6; гликозилированного эпитопа CD43, экспрессируемого на клетках острого лейкоза или лимфомы, но не на гематопоэтических предшественниках, гликозилированного эпитопа CD43, экспрессируемого на клетках негематопоэтических раковых заболеваний, карциноэмбрионального антигена (CEA); молекулы адгезии эпителиальных клеток (EPCAM); V7H3 (CD276); KIT (CD117); субъединицы рецептора интерлейкина-13 альфа-2 (IL-13Ra2 или CD213A2); мезотелина; рецептора интерлейкина 11 альфа (IL-11Ra); антигена стволовых клеток простаты (PSCA); протеиназы серина 21 (тестизина или PRSS21); рецептора сосудистого эндотелиального фактора роста 2 (VEGFR2); антигена Льюиса (Y); CD24; бета-рецептора фактора роста, полученного из тромбоцитов (PDGFR-бета); стадийно-специфического эмбрионального антигена-4 (SSEA-4); CD20; альфа-рецептора фолата (FRa или FR1); бета-рецептора фолата (FRb); рецепторной тирозин-протеинкиназы ERBB2 (Her2/neu); муцина 1, связанного с клеточной поверхностью (MUC1); рецептора эпидермального фактора роста (EGFR); молекулы адгезии нервных клеток (NCAM); простаза; простатической кислой фосфатазы (PAP); мутированного фактора удлинения 2 (ELF2M); эфрина B2; белка активации фибробластов альфа (FAP); рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (рецептора IGF-I), карбоангидразы IX (CAIX); субъединицы протеасомы (просомы, макропаина), бета-тип а, 9 (LMP2); гликопротеина 100 (gp100); слитого белка-онкогена, состоящего из кластерной области точки разрыва (BCR) и гомолога 1 вирусного онкогена мышшиной лейкозы Абельсона (Abl) (bcr-abl); тирозиназы; рецептора 2 эфрина типа А (EphA2); молекулы адгезии сиалил Льюиса (sLe); ганглиозида GM3 (aNeu5Ac (2-3) bDClalp (1-4) bDGlcр (1-1) Cer); трансглутаминазы 5 (TGS5); высокомолекулярного антигена, ассоциированного с меланомой (HMWMAA); о-ацетил-GD2 ганглиозида (OAcGD2); эндотелиального маркера 1 опухоли (TEM1/CD248); эндотелиального маркера 7 опухоли (TEM7R); клодина 6 (CLDN6); рецептора гормонов, стимулирующих щитовидную железу (TSHR); рецептора, связанного с G белком, класса C, группы 5, члена D (GPRC5D); открытая рамка считывания 61 хромосомы X (CXORF61); CD97; CD179a; киназы анапластической лимфомы (ALK); полисиаловой кислоты; специфичной для плаценты 1 (PLAC1); гексахаридной части globoH гликоцерамида (GloboH); антигена дифференцировки молочной железы (NY-BR-1); уроплакина 2 (UPK2); клеточного рецептора вируса гепатита А 1 (HAVCR1); адренорецептора бета 3 (ADRB3); паннексина 3 (PANX3); G-белок-связанного рецептора 20 (GPR20); комплекса антигена 6 лимфоцитов, локуса К 9 (LY6K); обонятельного рецептора 51E2 (OR51E2); белка альтернативной рамки считывания TCR гамма (TARP); белка опухоли Вильмса (WT1); антигена 1 рака/яичка

(NY-ESO-1); антигена 2 рака/яичка (LAGE-1a); ассоциированного с меланомой антигена 1 (MAGE-A1); вариантного гена 6 ETS транслокации, расположенного на хромосоме 12p (ETV6-OMJL); белка спермы 17 (SPA17); члена 1A семейства X антигенов (XAGE1); ангиопоэтинсвязывающего рецептора 2 клеточной поверхности (Tie 2); антигена-1 яичка рака меланомы (MAD-CT-1); антигена-2 яичка рака меланомы (MAD-CT-2); Fos-связанного антигена 1; опухолевого белка p53 (p53); мутанта p53; простерина; сурвивина; теломеразы; опухолевого антигена-1 рака карциномы простаты (PCT A-1 или Galectin 8), антигена 1 меланомы, распознаваемого Т-клетками (MelanA или MART1); мутанта крысиной саркомы (Ras); обратной транскриптазы теломеразы человека (hTERT); точек разрыва саркомы; ингибитора апоптоза меланомы (ML-IAP); ERG (ген слияния трансмембранной протеазы серина 2 (TMPRSS2), ETS); N-ацетилглюкозаминилтрансферазы V (NA17); белка с парными боксами Pax-3 (PAX3); андрогенного рецептора; циклина B1; гомолога, полученного из нейробластомы, вирусного онкогена v-мус птичьего миелоцитоматоза (MYCN); члена C семейства Ras гомологов (RhoC); родственного тирозиназе белка 2 (TRP-2); цитохрома P450 1B 1 (CYP1B1); подобного CCCTC-связывающему фактору (белку с цинковыми пальцами) (BORIS или брат регулятора сайтов импринтинга), антигена 3 плоскоклеточной карциномы, распознаваемого Т-клетками (SART3); белка с парными боксами Pax-5 (PAX5); проакрозин-связывающего белка sp32 (OY-TE51); лимфоцит-специфической протеинтирозинкиназы (LCK); якорного белка 4 киназы A (AKAP-4); X точки разрыва 2 синовиальной саркомы (SSX2); рецептора конечных продуктов усиленного гликирования (RAGE-1); почечного повсеместного 1 (RU1); почечного повсеместного 2 (RU2); легумаина; вируса папилломы человека E6 (HPV E6); вируса папилломы человека E7 (HPV E7); кишечной карбоксилэстеразы; мутированного белка теплового шока 70-2 (mut hsp70-2); CD79a; CD79B; CD72; связанного с лейкоцитами иммуноглобулин-подобного рецептора 1 (LAIR1); Fc-фрагмента рецептора IgA (FCAR или CD89); члена 2 подгруппы A лейкоцитарного иммуноглобулиноподобного рецептора (LILRA2); член f семейства, подобного молекуле CD300 (CD300LF); член A семейства 12 доменов лектинов C-типа (CLEC12A); антигена 2 стромальных клеток костного мозга (BST2); белка 2 подобного EGF-подобный модуль-содержащему муцин-подобному рецептору гормонов (EMR2); лимфоцитарного антигена 75 (LY75); глипикана-3 (GPC3); Fc-рецепторо-подобного 5 (FCRL5); и иммуноглобулин лямбда-подобного полипептида 1 (IGLL1), MPL, биотина, с-МЫС эпитопного тэга, CD34, LAMP1 TROP2, GFRalpha4, CDH17, CDH6, NYBR1, CDH19, CD200R, SleA (CA19.9; антиген сиалила Льюиса); Фукозил-GM1, PTK7, gpNMB, CDH1-CD324, DLL3, CD276/B7H3, IL11Ra, IL13Ra2, CD179b-IGL11, TCRгамма-дельта, NKG2D, CD32 (FCGR2A), Tn антигена, Tim1-/HVFR1, CSF2RA (GMCSFR-альфа), TGFбетаP2, Люис антигена, цепи TCR-бета1, цепи TCR-бета2, цепи TCR-гамма, цепи TCR-дельта, FITC, рецептора леутенизирующего гормона (LHR), рецептора фолликулостимулирующего гормона (FSHR), рецептора гормона гонадотропина (CGHR или GR), CCR4, GD3, SLAMF6, SLAMF4, гликопротеина оболочки HIV1, HTLV1-Tax,

CMV pp65, EBV-EBNA3c, KSHV K8.1, KSHV-gH, гемагглютинина вируса гриппа А (HA), GAD, PDL1, гуанилил циклазы С (GCC), аутоантитела к десмоглеину 3 (Dsg3), аутоантитела к десмоглеину 1 (Dsg1), HLA, HLA-A, HLA-A2, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA -DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, HLA-G, IgE, CD99, Ras G12V, тканевого фактора 1 (TF1), AFP, GPRC5D, Клаудина18.2 (CLD18A2 или CLDN18A.2), Р-гликопротеина, STEAP1, Liv1, нектин-4, Кристо, gpA33, BST1/CD157, хлоридного канала с низкой проводимостью и антигена, распознаваемого антителом TNT или их комбинации.

[00198] В некоторых вариантах осуществления антигены, специфичные для заболевания, на которое может быть нацелен не встречающийся в природе иммунный рецептор, например, CAR, при экспрессии отдельно или с помощью дополнительных модулей, как описано в данном документе, включают, но не ограничиваются этим, один или большее количество из 4-1BB, 5T4, антиген аденокарциномы, альфа-фетопроtein, BAFF, клетка В-лимфомы, антиген C242, CA-125, карбоангидраза 9 (CA-IX), C-MET, CCR4, CD152, CD19, CD20, CD200, CD22, CD221, CD23 (рецептор IgE), CD28, CD30 (TNFRSF8), CD33, CD4, CD40, CD44 v6, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CD123, CEA, CNTO888, CTLA-4, DR5, EGFR, EpCAM, CD3, FAP, дополнительный домен фибронектина-В, рецептор фолата 1, GD2, ганглиозид GD3, гликопротеин 75, GPNMB, HER2/neu, HGF, киназа рецептора фактора рассеяния человека, рецептор IGF-1, IGF-I, IgG1, L1 -CAM, IL-13, IL-6, рецептор инсулиноподобного фактора роста I, интегрин $\alpha 5\beta 1$, интегрин $\alpha v\beta 3$, LAMP1, MORAb-009, MS4A1, MUC1, муцин CanAg, N-гликолилнейраминная кислота, NPC-1C, PDGF-R α , PDL192, фосфатидилсерин, клетки карциномы простаты, RANKL, RON, ROR1, SCH 900105, SDC1, SLAMF7, TAG-72, тенасцин С, TGF бета 2, TGF- β , TRAIL-R1, TRAIL-R2, опухолевый антиген STAA16.88, VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR2, виментин или их комбинации. Другие антигены, специфичные для рака, будут очевидные для специалистов в данной области и могут использоваться в связи с альтернативными вариантами осуществления данного изобретения.

[00199] CAR, когда используется отдельно или с вспомогательными модулями, как описано в данном документе, может содержать антигенсвязывающий домен (*например*, антитело или фрагмент антитела), который связывается с поддерживающим заболеванием антигеном (*например*, поддерживающим заболеванием антигеном, как описано в данном документе). В некоторых вариантах осуществления поддерживающий заболеванием антиген представляет собой антиген, присутствующий в клетках, который поддерживает выживание и пролиферацию вызывающих заболевание клеток. В некоторых вариантах осуществления поддерживающий заболеванием антиген представляет собой антиген, присутствующий в стромальной клетке или в клетке-супрессоре миелоидного происхождения (MDSC). Стромальные клетки могут секретировать факторы роста и цитокины, способствуя пролиферации клеток в микроокружении. Клетки MDSC могут блокировать пролиферацию и активацию Т-клеток. Не желая быть связанными какой-либо

теорией, в некоторых вариантах осуществления CAR-экспрессирующие клетки разрушают поддерживающие заболевание клетки, тем самым косвенно блокируя рост или выживание вызывающих заболевание клеток.

[00200] В некоторых вариантах осуществления антиген стромальных клеток выбран из одного или большего количества из: антигена 2 стромальных клеток костного мозга (BST2), белка активации фибробластов (FAP) и тенасцина. В одном варианте осуществления FAP-специфическое антитело конкурирует за связывание или имеет те же CDR, что и сибротузумаб. В вариантах осуществления антиген MDSC выбран из одного или большего количества из: CD33, CD11b, C14, CD15 и CD66b. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления поддерживающий заболевание антиген выбран из одного или большего количества из: антигена 2 стромальных клеток костного мозга (BST2), белка активации фибробластов (FAP) или тенасцина, CD33, CD11b, C14, CD15 и CD66b.

[00201] В другом варианте осуществления данное изобретение относится к не встречающемуся в природе иммунному рецептору, например, CAR, который связывается с одним и тем же эпитопом на разных мишенях, описанных в **Таблицах 6А-С**, как любой из неприродных иммунных рецепторов по данному изобретению (*например*, CAR, которые могут конкурировать друг с другом за привязку к различным целям с любым из CAR по данному раскрытию). В некоторых вариантах осуществления антигенспецифичные домены этих неприродных иммунных рецепторов, например, CAR, могут быть получены из фрагментов vL, фрагментов vH или фрагментов scFv антител. В некоторых вариантах осуществления эталонными антителами для исследований перекрестной конкуренции для определения эпитопа-мишени, распознаваемого не встречающимся в природе иммунным рецептором, например, CAR, по данному изобретению являются scFv, описанные в **Таблице 6С**, в данном документе, имеющие последовательности, как продемонстрировано в SEQ ID NO: 4555-4815, 11165-11401, 15070-15101 (**Таблица 6С**) или как описано в Таблицах 5-6 PCT/US2017/064379. В иллюстративном варианте осуществления эталонный scFv FMC63 (vL-vH), представленный SEQ ID NO: 4555, может использоваться в перекрестных исследованиях для определения целевого эпитопа, распознаваемого обычными CAR на основе FMC63, и остовов данного раскрытия. В некоторых вариантах осуществления эталонные фрагменты vH для исследований перекрестной конкуренции для определения эпитопа-мишени, распознаваемого не встречающимся в природе иммунным рецептором, например, CAR, раскрытого в данном описании раскрытия, представляют собой фрагменты vH, имеющие последовательности, как продемонстрировано в SEQ ID NO: 4474-4514. В некоторых вариантах осуществления эталонные каркасы, не связывающиеся с неиммуноглобулиновым антигеном, для исследований перекрестной конкуренции для определения эпитопа-мишени, распознаваемого не встречающимся в природе иммунным рецептором, например, CAR, в описании, описанном в данном документе, не являются каркасами связывания антигенов иммуноглобулина, имеющими последовательности,

продемонстрированные в SEQ ID NO: 4515-4519. В некоторых вариантах осуществления эталонные лиганды для исследований перекрестной конкуренции для определения целевого эпитопа, распознаваемого с помощью CAR по данному раскрытию, описанного в данном документе, представляют собой лиганды, имеющие последовательности, SEQ ID NO: 4544-4554. В некоторых вариантах осуществления эталонными CAR для исследований перекрестной конкуренции с различными целевыми объектами являются CAR, SEQ ID которых продемонстрированы в **Таблицах 10-14**.

[00202] В другом варианте осуществления эталонными антителами для исследований перекрестной конкуренции для определения эпитопов-мишеней, распознаваемых CAR, нацеленными на MPL по данному изобретению, являются антитела mAb-1.6, mAb-1.111, mAb-1.75, mAb-1.78, mAb-1.169, и mAb-1.36, описанные в заявке на патент США 2012/0269814 A1.

[00203] В другом варианте осуществления эталонные scFv для исследований перекрестной конкуренции для определения эпитопов-мишеней, распознаваемых CAR, нацеленными на MPL по данному изобретению, представляют собой scFv, имеющие последовательности, как продемонстрировано в SEQ ID NO: 4720-4727, в **Таблице 6С** или как описано в Таблицах 5-6 PCT/US2017/064379.

[00204] В другом варианте осуществления эталонными лигандами для исследований перекрестной конкуренции для определения эпитопов-мишеней, распознаваемых CAR-мишенями, нацеленными на MPL по данному изобретению, являются лиганды TPO и mTPO, имеющие последовательности, перечисленные в SEQ ID NO: 4544-4545.

[00205] В другом варианте осуществления эталонные CAR для исследований перекрестной конкуренции с целью определения эпитопов-мишеней, распознаваемых CAR-мишенями для MPL по данному изобретению, являются CAR, имеющие последовательности, как продемонстрировано в SEQ ID NO: 5120-5126.

[00206] В предпочтительном варианте осуществления CAR, нацеленные на MPL по данному изобретению, связываются с эпитопом, соответствующим последовательностям, продемонстрированным в SEQ ID NO: 15160.

[00207] В одном варианте осуществления эталонные scFv для исследований перекрестной конкуренции с целью определения эпитопов-мишеней, распознаваемых CD19-нацеливающими CAR по данному изобретению, представляют собой scFv, имеющие последовательности, как продемонстрировано в SEQ ID NO: 4555-4568 и в **Таблице 6С**, или как описано в Таблицах 5-6 PCT/US2017/064379. В другом варианте осуществления эталонные CAR для исследований перекрестной конкуренции с целью определения эпитопов-мишеней, распознаваемых CD19-нацеливающими CAR по данному изобретению, представляют собой CAR, имеющие последовательности, как продемонстрировано в SEQ ID NO: 4929-4943.

[00208] В одном варианте осуществления эталонные scFv для исследований перекрестной конкуренции для определения эпитопов-мишеней, распознаваемых CAR-

мишенями для CD20 по данному изобретению, представляют собой scFv, нацеленные на CD20 и имеющие SEQ ID, как указано в **Таблице 6С** или как описано в Таблицах 5-6 PCT/US2017/064379. В другом варианте осуществления эталонные CAR для исследований перекрестной конкуренции с целью определения эпитопов-мишеней, распознаваемых CD20-нацеливающими CAR по данному изобретению, представляют собой CAR, нацеленные на CD20 и имеющие SEQ ID, как указано в **Таблицах 12**.

[00209] В предпочтительном варианте осуществления CAR, нацеленные на CD20 по данному изобретению, связываются с эпитопами, соответствующими одной или нескольким последовательностям, продемонстрированным в SEQ ID NO: 15149-15154.

[00210] В одном варианте осуществления эталонные scFv для исследований перекрестной конкуренции с целью определения эпитопов-мишеней, распознаваемых CAR, нацеленными на ВСМА по данному изобретению, представляют собой scFv, нацеленные на CD20 и имеющие SEQ ID, как указано в **Таблице 6С** или как описано в Таблицах 5-6 PCT/US2017/064379. В другом варианте осуществления эталонные CAR для исследований перекрестной конкуренции с целью определения эпитопов-мишеней, распознаваемых CAR-мишенями для ВСМА по данному изобретению, представляют собой CAR, нацеленные на ВСМА и имеющие SEQ ID, как указано в **Таблицах 12**.

[00211]

[00212] В предпочтительном варианте осуществления CAR, нацеленные на ВСМА по данному изобретению, связываются с эпитопами, соответствующими одной или нескольким последовательностям, продемонстрированным в SEQ ID NO: 15155-15159.

[00213] В одном варианте осуществления эталонные scFv для исследований перекрестной конкуренции против CAR, нацеленных на DLL3 по данному изобретению, представляют собой scFv, нацеленные на DLL3 и имеющие SEQ ID, как указано в **Таблице 6С** или как описано в Таблицах 5-6 PCT/US2017/064379. В другом варианте осуществления эталонными CAR для исследований перекрестной конкуренции против CAR, нацеленных на DLL3 по данному изобретению, являются CAR, нацеленные на DLL3 и имеющие SEQ ID, как указано в **Таблице 12**.

[00214] В одном варианте осуществления эталонные scFv для исследований перекрестной конкуренции против CAR, нацеленных на LAMP1 по данному изобретению, представляют собой scFv, нацеленные на LAMP1 и имеющие SEQ ID, как указано в **Таблице 6С** или как описано в Таблицах 5-6 PCT/US2017/064379. В другом варианте осуществления эталонные CAR для исследований перекрестной конкуренции против CAR, нацеленных на LAMP1 по данному изобретению, представляют собой CAR, нацеленные на LAMP1 и имеющие SEQ ID, как указано в **Таблице 12**.

[00215] В одном варианте осуществления эталонные scFv для исследований перекрестной конкуренции против CAR, нацеленных на TROP2 по данному изобретению, представляют собой scFv, нацеленные на TROP2 и имеющие SEQ ID, как указано в **Таблице 6С** или как описано в Таблицах 5-6 PCT/US2017/064379. В другом варианте осуществления эталонными CAR для исследований перекрестной конкуренции против

CAR, нацеленных на TROP2 по данному изобретению, являются CAR, нацеленные на TROP2 и имеющие SEQ ID, как указано в **Таблице 12**.

[00216] В одном варианте осуществления эталонные scFv для исследований перекрестной конкуренции против CAR, нацеленных на PTK7 по данному изобретению, представляют собой scFv, нацеленные на PTK7 и имеющие SEQ ID, как указано в **Таблице 6С** или как описано в Таблицах 5-6 PCT/US2017/064379. В другом варианте осуществления эталонными CAR для исследований перекрестной конкуренции против CAR, нацеленных на PTK7 по данному изобретению, являются CAR, нацеленные на PTK7 и имеющие SEQ ID, как указано в **Таблице 12**.

[00217] В одном варианте осуществления эталонные scFv для перекрестных конкурентных исследований против CD22, CD123, CD33, CD37, CD70, CD138, CS1, IL13Ra2, фолатного рецептора α , фолатного рецептора β , TCRB1, TCRB2, TCR $\gamma\delta$, CD30, мезотелина, Her2, EGFRviii и CAR, нацеленных на HIV1, по данному изобретению, представляют собой scFv, нацеленные на эти антигены и имеющие SEQ ID, как указано в **Таблице 6С** или как описано в Таблицах 5-6 PCT/US2017/064379. В другом варианте осуществления эталонные CAR для перекрестных исследований против CD22, CD123, CD33, CD37, CD70, CD138, CS1, IL13Ra2, фолатного рецептора α , фолатного рецептора β , TCRB1, TCRB2, TCR $\gamma\delta$, CD30, мезотелина, Her2, EGFRviii и CAR, нацеленных на HIV1 по данному изобретению, представляют собой CAR, нацеленные на эти антигены и имеющие SEQ ID, как указано в **Таблице 12**.

[00218] В некоторых вариантах осуществления CAR, описанные в данном документе, содержат шарнирную или линкерную область между антигенспецифическим доменом и трансмембранным доменом. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнирная область содержит любое одно или более из человеческого CD8 α или фрагмента Fc антитела или его функциональный эквивалент, его фрагмента или его производного, в шарнирной области человеческого CD8 α или антитела или его функциональный эквивалент, фрагмент или производное его область CH2 антитела, область CH3 антитела, искусственная спейсерная последовательность и их комбинации. В иллюстративных вариантах осуществления шарнирная область содержит любую одну или большее количество из (i) шарнирной, CH2 и CH3-областей IgG4, (ii) шарнирной области IgG4, (iii) шарнирной и CH2-области IgG4, (iv) шарнирной области CD8 α , (v) шарнирной области CH2 и CH3-областей IgG1, (vi) шарнирной области IgG1, (vi) шарнирной области и CH2-области IgG1 или (vii) их комбинации.

[00219] В некоторых вариантах осуществления, две или более функциональные области не встречающихся в природе иммунных рецепторов, *например*, CAR, как описано в данном документе, отделены друг от друга одним или несколькими линкерами. Линкеры представляют собой олиго- или полипептидные области длиной приблизительно от 1 до 100 аминокислот, которые связывают вместе любые домены/области не встречающихся в природе иммунных рецепторов, *например*, CAR, по данному изобретению. В некоторых вариантах осуществления линкеры могут быть, *например*, длиной 5-12 аминокислот,

длиной 5-15 аминокислот или длиной 5-20 аминокислот. Линкеры могут состоять из гибких остатков, таких как глицин и серин, так что смежные белковые домены могут свободно перемещаться относительно друг друга. Более длинные линкеры, например, содержащие более 100 аминокислот, могут использоваться в связи с альтернативными вариантами осуществления данного изобретения и могут быть выбраны, например, для обеспечения того, чтобы два соседних домена не подвергались стерическому воздействию друг на друга.

[00220] Как описано в данном документе, CAR, описанные в данном документе, содержат трансмембранный домен. Трансмембранный домен может содержать трансмембранную последовательность из любого белка, который имеет трансмембранный домен, включая любой из трансмембранных белков типа I, типа II или типа III. Трансмембранный домен CAR по данному изобретению также может содержать искусственную гидрофобную последовательность. Трансмембранные домены описанных в данном документе CAR могут быть выбраны таким образом, чтобы трансмембранный домен не димеризовался. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит любой из остовов, описанных в данном документе, имеющих трансмембранный домен, выбранный из трансмембранного домена альфа, бета или зета цепи рецептора T-клеток, CD3ε, CD3ζ, CD3γ, CD3δ, CD28, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD1a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), CD160, CD19, IL2R бета, IL2R гамма, IL7R α, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD1-Id, ITGAE, CD103, ITGAL, CD-11a, LFA-1, ITGAM, CD-1b, ITGAX, CD1-1c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (тактильный), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108)), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D и/или NKG2C.

[00221] Трансмембранный домен может содержать одну или большее количество дополнительных аминокислот (*например*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 до 15 аминокислот) на любом конце трансмембранной области (*например*, одну или большее количество аминокислот, простирающихся внеклеточно, и/или одну или большее количество аминокислот, простирающихся внутриклеточно) в трансмембранной области. В одном аспекте трансмембранный домен является смежным с одним из других доменов CAR. В одном варианте осуществления трансмембранный домен может происходить из того же белка, из которого получен сигнальный домен, костимуляторный домен или шарнирный домен. В другом аспекте трансмембранный домен не происходит из того же белка, из которого получен любой другой домен CAR.

[00222] В различных вариантах осуществления выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие не встречающиеся в природе иммунные рецепторы, *например* CAR, компоненты остовов, описанных в данном документе, кодируют ноль, один, два, три или

более внутриклеточных сигнальных доменов.

[00223] Как описано в данном документе, не встречающиеся в природе иммунные рецепторы, *например* CAR, описанные в данном документе, могут необязательно содержать внутриклеточный сигнальный домен. Этот домен может быть цитоплазматическим и может преобразовывать сигнал эффекторной функции и направлять клетку на выполнение своей специализированной функции. Примеры внутриклеточных доменов сигнализации включают в себя, но не ограничиваются ими, ζ цепи рецептора Т-клеток или любой из ее гомологов (*например*, η цепь, CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ , Fc - ϵ R1 γ и β цепи, MB1 (Ig α) цепь, B29 (Ig β) цепь, и *т.д.*), полипептиды CD3 (Δ , δ и ϵ), тирозинкиназы семейства Syk (Syk, ZAP 70 и *др.*), тирозинкиназы семейства SRC (Lck, Fyn, Lyn и *др.*) и другие молекулы, участвующие в трансдукции Т-клеток, такие как CD2, CD5 и CD28. В частности, внутриклеточным доменом сигнализации могут быть зета - цепь CD3 человека, Fc- γ RIII, Fc ϵ RI, цитоплазматические хвосты рецепторов, несущих цитоплазматические хвосты Fc рецепторов, иммунорецепторный мотив активации на основе тирозин (ITAM) или их комбинации. Дополнительные внутриклеточные сигнальные домены будут очевидны для специалистов в данной области техники и могут использоваться в связи с альтернативными вариантами осуществления данного изобретения. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный домен одной или нескольких из зета-цепи CD3 человека, Fc γ RIII, Fc ϵ RI, цитоплазматических хвостов рецепторов, несущих цитоплазматические хвосты Fc рецепторов, иммунорецепторный мотив активации на основе тирозин (ITAM) или их комбинации.

[00224] В различных вариантах осуществления выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие не встречающийся в природе иммунный рецептор, *например* CAR, компоненты остовов, описанных в данном документе, кодируют ноль, один, два, три или более костимуляторных доменов. В иллюстративных вариантах осуществления костимуляторный домен содержит сигнальный домен из любого одного или большего количества из CD28, CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), Dap10, CD27, CD2, CD5, ICAM-1, LFA-1, Lck, TNFR-I, TNFR-II, Fas, CD30, CD40 и их комбинации. Различные компоненты не встречающихся в природе иммунных рецепторов, *например*, CAR, раскрыты в описании выше и в других местах данного документа. Опять же, следует признать, что в данном раскрытии представлены, например, CAR, содержащие экто-домен, содержащий антиген-специфический связывающий домен, присоединенный через «шарнир» линкера к трансмембранному домену, который, в свою очередь, связан с эндодоменом, содержащим один или большее количество стимулирующих доменов и, необязательно, один или большее количество внутриклеточных сигнальных доменов.

[00225] В данном документе представлены один или большее количество полипептидов, кодируемых одной или несколькими молекулами нуклеиновых кислот, кодирующими обычные CAR 1-6 (**Таблица 1**), или любой одной или несколькими основными цепями 1-72, описанными в данном документе (**Таблица 2**).

[00226] В данном документе также представлены один или большее количество полипептидов, кодируемых одной или несколькими молекулами нуклеиновой кислоты, кодирующими обычные CAR 1-6. В некоторых вариантах осуществления антигенспецифический домен указанных CAR специфичен к одному, двум, трем или более антигенам на клетках-мишенях, таких как раковые клетки. Как описано в данном документе, каждый компонент CAR является смежным и находится в одной и той же рамке считывания друг с другом компонентов CAR. В некоторых вариантах осуществления CAR, содержащий остов, содержит более одного антигенспецифического домена, каждый из антигенспецифических доменов является смежным и находится в той же рамке считывания, что и другие антигенспецифические домены в том же CAR.

[00227] В данном документе также представлены один или большее количество полипептидов, кодируемых одной или несколькими молекулами нуклеиновых кислот, кодирующими остовы 1-10, содержащие обычный CAR I и вспомогательный модуль, кодирующий NF-κB стимулирующую молекулу (*например*, vFLIP-K13, h NEMO-K277A, FKBPx2-hNEMO-K277A, FKBPx2-hNEMO-L753 (251), FKBPx2-hNEMO-L600 (200), FKBPx2-RIP-ID, IKK2-S177E-S181E, IKK1-S176E-S180E, MyD88-L265P TCL1A или их варианты), как описано в данном документе. Вспомогательный модуль в остовах 1-10 может быть заменен другими вспомогательными модулями, кодирующими разные молекулы, включая разные активаторы NF-κB (*например*, K13-opt, hNEMO-K277A-delta-V249-K255 или hNEMO-K277L и т. д.). Также в данном документе представлены один или большее количество полипептидов, кодируемых одной или несколькими молекулами нуклеиновых кислот, кодирующими остовы 11-12, включающие обычный CAR I и вспомогательный модуль, кодирующий IgSP-[hTRAC-opt2] и IgSP-[hTRBC-opt2]. В некоторых вариантах осуществления антигенспецифический домен CAR, содержащий остовы-1-12, специфичен к одному, двум, трем или более антигенам на клетках-мишенях, таких как раковые клетки. Как описано в данном документе, каждый компонент CAR является смежным и находится в одной и той же рамке считывания с другими компонентами CAR, содержащими остовы 1-12. В некоторых вариантах осуществления в CAR, содержащем остовы 1-12, содержится более одного антигенспецифического домена, каждый из антигенспецифических доменов является смежным и находится в той же рамке считывания, что и другие антигенспецифические домены в том же CAR.

[00228] В данном документе также представлены один или большее количество полипептидов, кодируемых одной или несколькими молекулами нуклеиновых кислот, кодирующими остовы 13-22, включающие обычный CAR II и вспомогательный модуль, кодирующий NF-κB стимулирующую молекулу (*например*, vFLIP-K13, h NEMO-K277A, FKBPx2-hNEMO-K277A, FKBPx2-hNEMO-L753 (251), FKBPx2-hNEMO-L600 (200), FKBPx2-RIP-ID, IKK2-S177E-S181E, IKK1-S176E-S180E, MyD88-L265P TCL1A или их варианты), как описано в данном документе. Вспомогательный модуль в остовах 13-22 может быть заменен другими вспомогательными модулями, кодирующими разные молекулы, включая различные активаторы NF-κB (*например*, K13-opt, hNEMO-K277A-

delta-V249-K255 или hNEMO-K277L и т. д.). В некоторых вариантах осуществления антигенспецифический домен CAR, содержащий остовы-13-22, специфичен к одному, двум, трем или более антигенам на клетках-мишенях, таких как раковые клетки. Как описано в данном документе, каждый компонент CAR является смежным и находится в одной и той же рамке считывания с другими компонентами CAR, содержащими остовы 13-24. В некоторых вариантах осуществления в CAR, содержащем остовы 13-24, содержится более одного антигенспецифического домена, каждый из антигенспецифических доменов является смежным и находится в той же рамке считывания, что и другие антигенспецифические домены в том же CAR.

[00229] Также в данном документе представлен один или большее количество полипептидов, кодируемых одной или несколькими молекулами нуклеиновых кислот, кодирующими остовы 37-46, содержащие Ab-TCR и вспомогательный модуль, кодирующий NF-κB стимулирующую молекулу (*например*, vFLIP-K13, h NEMO-K277A, FKBPx2-hNEMO-K277A, FKBPx2-hNEMO-L753 (251), FKBPx2-hNEMO-L600 (200), FKBPx2-RIP-ID, IKK2-S177E-S181E, IKK1-S176E-S180E, MyD88-L265P TCL1A или их варианты), как описано в данном документе. Вспомогательный модуль в остовах с 37 по 46 может быть заменен другими вспомогательными модулями, кодирующими разные молекулы, включая разные активаторы NF-κB (*например*, K13-opt, hNEMO-K277A-delta-V249-K255 или hNEMO-K277L и т. д.).

[00230] В данном документе также представлены один или большее количество полипептидов, кодируемых одной или несколькими молекулами нуклеиновых кислот, кодирующими остовы 49-58, содержащие двухцепочечный cTCR/SIR и вспомогательный модуль, кодирующий NF-κB стимулирующую молекулу (*например*, vFLIP-K13, h NEMO-K277A), FKBPx2-hNEMO-K277A, FKBPx2-hNEMO-L753 (251), FKBPx2-hNEMO-L600 (200), FKBPx2-RIP-ID, IKK2-S177E-S181E, IKK1-S176E-S180E, MyD88-L265P TCL-1A или их варианты), как описано в данном документе. Вспомогательный модуль в остовах 49-58 может быть заменен другими вспомогательными модулями, кодирующими разные молекулы, включая разные активаторы NF-κB (*например*, K13-opt, hNEMO-K277A-delta-V249-K255 или hNEMO-K277L и т. д.).

[00231] В данном документе также представлены один или большее количество полипептидов, кодируемых одной или несколькими молекулами нуклеиновых кислот, кодирующими остовы 61-70, которые включают в себя cTCR/SIR с полуторными цепями (ОНС) и вспомогательный модуль, кодирующий NF-κB стимулирующую молекулу (*например*, vFLIP-K13, hNEMO -K277A, FKBPx2 -hNEMO-K277A, FKBPx2-hNEMO-L753 (251), FKBPx2-hNEMO-L600 (200), FKBPx2-RIP-ID, IKK2-S177E-S181E IKK1-S176E-S180E, MyD88-L265P, TCL-1A или их варианты), как описано в данном документе. Вспомогательный модуль в остовах 61-70 может быть заменен другими вспомогательными модулями, кодирующими разные молекулы, включая различные селективные активаторы NF-κB (*например*, K13-opt, hNEMO-K277A-delta-V249-K255 или hNEMO-K277L и т. д.).

[00232] В различных вариантах осуществления полипептиды, кодируемые молекулами нуклеиновой кислоты, кодирующими CAR, которые являются частью остовов, описанных в данном документе, таких как остов-1, остов-2, остов-13, остов-14, остов-37, остов-38, остов-49, остов-50, остов-60 или остов-61, включает в себя один, два, три или более NF-кВ стимулирующих молекул (*например*, K13-vFLIP, K13opt, NEMO, NEMO K277A, NEMO-K277L человека, NEMO-K277A-DeltaV249-K255 человека или NEMO K270A мыши или их варианты).

[00233] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены полипептиды, кодируемые молекулами нуклеиновой кислоты, кодирующими CAR, которые являются частью обычных CAR 1-6 или являются частью остовов, описанных в данном документе, таких как остов-1, остов-2, остов-13, остов-14, остов-37, остов-38, остов-49, остов-50, остов-60 или остов-61, при этом антигенспецифический домен указанных CAR специфичен к рецептору тромбопоэтина, MPL. В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены полипептиды, кодируемые молекулами нуклеиновой кислоты, кодирующими CAR, которые являются частью традиционных CAR 1-6 или являются частью остовов, описанных в данном документе, таких как остов-1, остов-2, остов-13, остов-14, остов-37, остов-38, остов-49, остов-50, остов-60 или остов-61, при этом антигенспецифический домен указанных CAR специфичен к CD19. В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены полипептиды, кодируемые молекулами нуклеиновой кислоты, кодирующими CAR, которые являются частью традиционных CAR 1-6 или являются частью остовов, описанных в данном документе, таких как остов-1, остов-2, остов-13, остов-14, остов-37, остов-38, остов-49, остов-50, остов-60 или остов-61, при этом антигенспецифический домен указанных CAR специфичен к CD20. В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены полипептиды, кодируемые молекулами нуклеиновой кислоты, кодирующими CAR, которые являются частью традиционных CAR 1-6 или являются частью остовов, описанных в данном документе, таких как остов-1, остов-2, остов-13, остов-14, остов-37, остов-38, остов-49, остов-50, остов-60 или остов-61, при этом антигенспецифический домен указанных CAR специфичен к CD22. В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены полипептиды, кодируемые молекулами нуклеиновой кислоты, кодирующими CAR, которые являются частью традиционных CAR 1-6 или являются частью остовов, описанных в данном документе, таких как остов-1, остов-2, остов-13, остов-14, остов-37, остов-38, остов-49, остов-50, остов-60 или остов-61, при этом антигенспецифический домен указанных CAR специфичен к CD23. В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены полипептиды, кодируемые молекулами нуклеиновой кислоты, кодирующие CAR, которые являются частью обычных CAR 1-6 или являются частью остовов, описанных в данном документе, такие как остов-1, остов-2, остов-13, остов-14, остов-37, остов-38, остов-49, остов-50, остов-60 или остов-61, при этом антигенспецифический домен указанных CAR специфичен к CD30. В некоторых вариантах осуществления в

остов-60 или остов-61, при этом антигенспецифический домен указанных CAR специфичен к CD79b. В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены полипептиды, кодируемые молекулами нуклеиновой кислоты, кодирующими CAR, которые являются частью традиционных CAR 1-6 или являются частью остовов, описанных в данном документе, таких как остов-1, остов-2, остов-13, остов-14, остов-37, остов-38, остов-49, остов-50, остов-60 или остов-61, при этом антигенспецифический домен указанных CAR специфичен к Lym1. В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены полипептиды, кодируемые молекулами нуклеиновой кислоты, кодирующими CAR, которые являются частью традиционных CAR 1-6 или являются частью остовов, описанных в данном документе, таких как остов-1, остов-2, остов-13, остов-14, остов-37, остов-38, остов-49, остов-50, остов-60 или остов-61, при этом антигенспецифический домен указанных CAR специфичен к Lym2. В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены полипептиды, кодируемые молекулами нуклеиновой кислоты, кодирующими CAR, которые являются частью традиционных CAR 1-4 или являются частью остовов, описанных в данном документе, таких как остов-1, остов-2, остов-13, остов-14, остов-37, остов-38, остов-49, остов-50, остов-60 или остов-61, при этом антигенспецифический домен указанных CAR специфичен к CLD18A2. В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены полипептиды, кодируемые молекулами нуклеиновой кислоты, кодирующими CAR, которые являются частью традиционных CAR 1-4 или являются частью остовов, описанных в данном документе, таких как остов-1, остов-2, остов-13, остов-14, остов-37, остов-38, остов-49, остов-50, остов-60 или остов-61, при этом антигенспецифический домен указанных CAR специфичен к эпитопу CD43, экспрессируемому на лейкозных клетках. В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены полипептиды, кодируемые молекулами нуклеиновой кислоты, кодирующими CAR, которые являются частью традиционных CAR 1-4 или являются частью остовов, описанных в данном документе, таких как остов-1, остов-2, остов-13, остов-14, остов-37, остов-38, остов-49, остов-50, остов-60 или остов-61, при этом антигенспецифический домен указанных CAR специфичен к CD179a. В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены полипептиды, кодируемые молекулами нуклеиновой кислоты, кодирующими CAR, которые являются частью традиционных CAR 1-6 или являются частью остовов, описанных в данном документе, таких как остов-1, остов-2, остов-13, остов-14, остов-37, остов-38, остов-49, остов-50, остов-60 или остов-61, при этом антигенспецифический домен указанных CAR специфичен к Fc-части антитела (*m.e.* Ig Fc). Пример CAR с антигенспецифическим доменом, специфичным к Fc Ig, представлен SEQ ID NO: 1629 и содержит внеклеточный домен CD16-V158 в качестве антигенспецифического домена. В любом из вышеизложенного, молекула нуклеиновой кислоты, кодирующей конструкт CAR дополнительно содержит последовательность, кодирующую NF-κB активатор, или альтернативно, последовательность, кодирующая NF-

kB активатор, может присутствовать на второй молекуле нуклеиновой кислоты.

[00234] Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие требуемые компоненты неприродных иммунных рецепторов, *например*, CAR, и/или описанную в данном документе селективную кодирующую последовательность селективного активатора NF-κB, могут быть получены с использованием рекомбинантных способов, известных в данной области, таких как, например, путем скрининга библиотек из клеток, экспрессирующих молекулу нуклеиновой кислоты, путем получения молекулы нуклеиновой кислоты из вектора, о котором известно, что он содержит такой же белок, или путем выделения непосредственно из клеток и тканей, содержащих ее, с использованием стандартных методик. Альтернативно, представляющая интерес нуклеиновая кислота может быть получена синтетическим путем, а не клонирована.

[00235] В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая не встречающиеся в природе иммунные рецепторы, *например* CAR, и/или вспомогательные молекулы (*например*, последовательность активатора NF-κB), описанная в данном документе, предоставляется в качестве транскрипта матричной РНК (мРНК). В другом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая не встречающиеся в природе иммунные рецепторы, *например* CAR, и/или вспомогательные молекулы (*например*, последовательность, кодирующая селективный активатор NF-κB), описанная в данном документе, предоставляется в виде конструкции ДНК.

[00236] Методы клонирования и экспрессии будут очевидны для специалиста в данной области и могут быть такими, как описано в WO 2015/142675; Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1 -4, Cold Spring Harbor Press, NY; June et al. 2009 Nature Reviews Immunology 9.10: 704-716; WO 01/96584; WO 01/29058; U.S. Pat. No. 6,326,193, содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки во всей их полноте, как если бы оно было изложено в данном документе. Физические способы введения полинуклеотидов в клетки-хозяева, такие как трансфекция фосфатом кальция и тому подобное, хорошо известны в данной области и будут очевидны для специалиста в данной области. В иллюстративных вариантах осуществления такие способы изложены в Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1 -4, Cold Spring Harbor Press, NY; Патенты США №№ 5350674 и 5585362, содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки во всей их полноте, как если бы оно было изложено в данном документе. В другом варианте осуществления вектор CAR трансдуцируется в клетку, *например*, Т-клетку или НК-клетку, вызывая временные возмущения в клеточной мембране с использованием микрофлюидного устройства, как описано в заявке на патент WO 2013/059343 A1 (PCT/US2012/060646) и в Ding X et al. Nat. Biomed. Eng. 1, 0039 (2017), содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, как если бы оно было изложено в данном документе.

[00237] Данное раскрытие изобретения обеспечивает рекомбинантную конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты,

кодирующую не встречающийся в природе иммунный рецептор, *например* CAR, при этом молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую один или большее количество антигенсвязывающих доменов, при этом нуклеотидные последовательности, кодирующие каждый из антигенсвязывающих доменов являются смежными и находится в той же рамке считывания, что и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие: (i) необязательный шарнир/линкер, (ii) трансмембранный домен и (iii) необязательный внутриклеточный домен или (a) а константную цепь рецептора Т-клеток. Типичная константная цепь рецептора Т-клеток, которую можно использовать при конструировании SIR, включает, но не ограничивается этим, константную цепь TCR α , TCR β 1, TCR β 2, TCR γ , TCR δ , preTCR α и их варианты и мутанты. В некоторых вариантах кодирующая последовательность активатора NF- κ B (*например*, селективного активатора NF- κ B) находится на той же конструкции рекомбинантной нуклеиновой кислоты, но при экспрессии не связана с не встречающимся в природе иммунным рецептором, *например*, CAR, но является скорее отрезается (*например*, через разрезаемый пептидный линкер) или является частью его собственной кассеты экспрессии в полинуклеотиде.

[00238] Данное раскрытие также обеспечивает вектор или векторы, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты или последовательности, кодирующие не встречающийся в природе иммунный рецептор, *например*, CAR, описанный в данном документе, и вспомогательный модуль. В некоторых вариантах осуществления вспомогательный модуль кодирует активатор NF- κ B, *например* селективный активатор NF- κ B. В некоторых вариантах осуществления селективный активатор NF- κ B представляет собой не встречающийся в природе активатор NF- κ B. В одном варианте осуществления не встречающийся в природе иммунный рецептор, *например* CAR, и вспомогательный модуль, *например* вспомогательный модуль, кодирующий активатор NF- κ B, кодируются одним вектором. В другом варианте осуществления не встречающийся в природе иммунный рецептор, *например* CAR, и вспомогательный модуль, *например* вспомогательный модуль, кодирующий активатор NF- κ B, кодируются более чем одним вектором. В еще одном варианте осуществления не встречающийся в природе иммунный рецептор, *например*, CAR, и вспомогательный модуль, *например* вспомогательный модуль, кодирующий активатор NF- κ B, каждый кодируется отдельным вектором или отдельными нуклеиновыми кислотами. В одном варианте осуществления два функциональных полипептидных звена (*например*, CAR и вспомогательный модуль) кодируются одним вектором или одной нуклеиновой кислотой. В одном варианте осуществления вектор или векторы выбирают из ДНК-вектора (ов), РНК-вектора (ов), плазмиды (д), лентивирусного (ых) вектора (ов), аденовирусного (ых) вектора (ов), ретровирусного (ых) вектора (ов), бакуловирусного (ых), вектора (ов) транспозона спящая красавица, или транспозона (ов) пиггибэк (piggyback). В одном варианте осуществления вектор представляет собой лентивирусный вектор или ретровирусный вектор. В другом варианте осуществления вектор представляет собой вектор транспозона спящая

красавица. Последовательности нуклеиновых кислот иллюстративных векторов представлены в SEQ ID NO: 3840-3841. Векторы pLenti-EF1 α (SEQ ID NO: 3840) и pLenti-EF1 α -DWPRE (SEQ ID NO: 3841) являются пустыми лентивирусными векторами, которые отличаются тем, что в pLenti-EF1 α -DWPRE отсутствует область WPRE. Последовательность нуклеиновой кислоты вектора pCCL3-MNDU3-WPRE приведена в SEQ ID NO: 7779. Не встречающаяся в природе кодирующая последовательность иммунного рецептора по данному изобретению может быть клонирована между сайтами Nhe I и Sal I в этих векторах.

[00239] Ретровирусный вектор также может быть, *например*, гаммаретровирусным вектором. Гаммаретровирусный вектор может включать, *например*, промотор, сигнал упаковки (ψ), сайт связывания праймера (PBS), один или большее количество (*например*, два) длинных концевых повтора (LTR) и интересующий трансген, *например*, ген, кодирующий не встречающийся в природе иммунный рецептор, *например*, CAR. В гаммаретровирусном векторе могут отсутствовать вирусные структурные гены, такие как gag, pol и env. Иллюстративные гаммаретровирусные векторы включают вирус мышинного лейкоза (MLV), вирус, формирующий селезеночный фокус (SFFV), и вирус миелопролиферативной саркомы (MPSV) и векторы, полученные из них. Другие гаммаретровирусные векторы описаны, *например*, в Tobias Maetzig et al. "Gammaretroviral Vectors: Biology, Technology and Application" Viruses. 2011 Jun; 3(6): 677-713. В другом варианте осуществления вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую желательные не встречающиеся в природе иммунные рецепторы по данному изобретению, представляет собой аденовирусный вектор (A5/35).

[00240] В некоторых вариантах осуществления вектор раскрытия может дополнительно содержать промотор. Неограничивающие примеры промотора включают, *например*, промотор MNDU3, промотор гена CMV IE, промотор EF-1 α , промотор убиквитина C, основной промотор или промотор фосфоглицераткиназы (PGK). В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор EF-1. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит поли (A) хвост. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит 3'UTR.

[00241] Данное раскрытие также включает конструкцию РНК, которая может быть непосредственно трансфицирована в клетку. Способ генерации мРНК для использования в трансфекции включает *in vitro* транскрипцию (IVT) шаблона с специально разработанных праймеров, с последующим дополнением поли А, чтобы произвести конструкцию, содержащую 3' и 5' нетранслируемую последовательность („UTR“) (*например*, 3' и/или 5' UTR, описанные в данном документе), 5' кэп (*например*, 5' кэп, описанный в данном документе) и/или участок внутренней посадки рибосомы (IRES) (*например*, IRES, описанный в данном документе), нуклеиновую кислоту, которая должна быть экспрессирована, и поли-хвост, обычно длиной 50-2000 оснований (SEQ ID NO: 3855). РНК, полученная таким образом, может эффективно трансфицировать различные виды клеток. В одном варианте осуществления шаблон включает в себя последовательность для

не встречающегося в природе иммунного рецептора, *например*, CAR, и/или стимулирующий молекулы NF-κB. В одном варианте осуществления вектор РНК CAR-NFκB трансдуцируют в клетку, *например* Т клетку или НК-клетку, путем электропорации. В другом варианте осуществления, вектор CAR РНК и/или активатора вектора NF-κB трансдуцируется в клетку, *например*, Т клетку или НК клетку, путем вызывания переходных возмущений в клеточной мембране с помощью микрофлюидного устройства. Различные цепи (или функциональные полипептидные звенья) также могут быть введены в клетку с использованием одного или большего количества векторов комбинации различных векторов или методик. В другом варианте осуществления не встречающийся в природе иммунный рецептор, *например*, CAR, может быть введен с помощью ретровирусного вектора в то время как вспомогательный модуль, кодирующий активатор NF-κB, вводится с использованием лентивирусного вектора. В другом аспекте, не встречающийся в природе иммунный рецептор, *например*, CAR, вводится с использованием лентивирусного вектора, в то время как вспомогательный модуль (*например*, NF-κB активатор) вводится с использованием транспозона спящая красавица. В еще одном аспекте не встречающийся в природе иммунный рецептор, *например*, CAR, вводится с использованием лентивирусного вектора в то время как вспомогательный модуль (*например*, NF-κB активатор) вводят с использованием РНК - трансфекции. В еще одном аспекте не встречающийся в природе иммунный рецептор, *например*, CAR, производится в клетке путем генетической рекомбинации в эндогенной TCR цепи локусов, используя способы модификации генов, известных в данной области техники в то время как вспомогательный модуль вводится с использованием лентивирусного или ретровирусного вектора.

[00242] РНК может быть введена в клетки-мишени с использованием любого из ряда различных способов, например, коммерчески доступных способов, которые включают, но не ограничиваются этим, электропорацию (Amaha Nucleofector-II (Amaha Biosystems, Кельн, Германия)) (ECM 830 (VTX) (Harvard Instruments, Бостон. Масачусетс) или Gene Pulser II (BioRad, Денвер, Колорадо), Multiporator (Eppendorf, Гамбург, Германия), трансфекцию, опосредованную катионными липосомами, с использованием липофекции, инкапсуляции полимера, трансфекции, опосредованной пептидами, или биолистических систем доставки частиц, таких как «генные пушки» (см., например, Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12 (8): 861-70 (2001), или с помощью микрофлюидных устройств, вызывающих кратковременные возмущения в клеточных мембранах (см., например, патентные заявки WO 2013/059343 A1 и PCT/US2012/060646).

[00243] В некоторых вариантах осуществления невирусный способ включает использование транспозона (также называемого транспонируемым элементом). В некоторых вариантах осуществления транспозон представляет собой фрагмент ДНК, который может вставлять себя в определенное место в геноме, например, фрагмент ДНК, который способен к саморепликации и вставке своей копии в геном, или фрагмент ДНК, который может быть сращен из более длинной нуклеиновой кислоты и вставлен в другое

место в геноме. Например, транспозон содержит последовательность ДНК, состоящую из инвертированных повторов, фланкирующих гены для транспозиции.

[00244] Иллюстартивные способы доставки нуклеиновой кислоты с использованием транспозона включают систему транспозонов спящая красавица (Sleeping Beauty) (SBTS) и систему транспозонов пиггибак (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; Kebriaei 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; and Ding et al. Cell. 122.3(2005):473-83, все из которых включены в данный документ посредством ссылки.

[00245] SBTS включает в себя два компонента: 1) транспозон, содержащий трансген, и 2) источник фермента транспозазы. Транспозаза может транспонировать транспозон из плазмиды-носителя (или другой донорной ДНК) в ДНК-мишень, такую как хромосома/геном клетки-хозяина. Например, транспозаза связывается с плазмидой/донорной ДНК-носителем, вырезает транспозон (включая трансген (ы)) из плазмиды и вставляет его в геном клетки-хозяина. См., *например*, Aronovich et al. *выше*.

[00246] Иллюстартивные транспозоны включают транспозон на основе рТ2. См., *например*, Grabundzija et al. Nucleic Acids Res. 41.3 (2013): 1829-47; и Singh et al. Рак Рез. 68.8 (2008): 2961-2971, все из которых включены в данный документ посредством ссылки. Иллюстартивные транспозазы включают в себя транспозазу типа Тс 1/mariner, *например*, транспозазу SB 10 или транспозазу SB 11 (гиперактивную транспозазу, которая может быть экспрессирована, *например*, из промотора цитомегаловируса). См., *например*, Aronovich et al. ; Kebriaei et al. ; и Grabundzija et al. все из которых включены в данный документ в качестве ссылки.

[00247] Применение SBTS обеспечивает эффективную интеграцию и экспрессию трансгена, *например*, нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR и/или активатор NF-κB описаны в данном документе. При условии, в данном документе методы формирования клетки, *например*, Т клетки или НК Т клетки или стволовой клетки или iPSC или синтетической Т клетки, которые стабильно экспрессируют CAR и/или NF-κB активатор описан в данном документе, *например*, с использованием системы транспозонов такие как SBTS.

[00248] В соответствии со способами, описанными в данном документе, в некоторых вариантах осуществления одна или большее количество нуклеиновых кислот, *например* плазмиды, содержащие компоненты SBTS, доставляются в клетку (*например*, Т клетку или НК Т клетку или стволовую клетку или iPSC или синтетическую Т-клетку). Например, нуклеиновую кислоту (ы) доставляют стандартными способами доставки нуклеиновой кислоты (*например*, плазмидной ДНК), *например* способами, описанными в данном документе, *например*, электропорацией, трансфекцией или липофекцией. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит транспозон, содержащий трансген, *например*, нуклеиновая кислота, кодирующая не встречающийся в

природе иммунный рецептор, *например*, CAR, и/или NF-κB активатор описана в данном документе. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновой кислоты содержит транспозон, содержащий трансген (*например*, нуклеиновая кислота, кодирующая не встречающийся в природе иммунный рецептор, *например*, CAR, и/или NF-κB активатор, описанные в данном документе), а также последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую фермент транспозазу. В других вариантах осуществления предоставляется система с двумя нуклеиновыми кислотами, *например*, с двойной плазмидной системой, *например*, где первая плазида содержит транспозон, содержащий трансген, а вторая плазида содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую фермент транспозазу. Например, первая и вторая нуклеиновые кислоты кодируются в клетке-хозяине.

[00249] Как описано выше и в других местах в данном документе, данное раскрытие демонстрирует, что коэкспрессия иммунного рецептора (например, CAR, эндогенного TCR или рекомбинантного TCR) по данному изобретению с молекулой стимулирующей NF-κB (*например*, селективным NF-κB активатором, *например*, не встречающимся в природе агентом активирующим NF-κB, *например* hNEMO-K277A), улучшает функции иммунных клеток, такие как выживание, экспансия, пролиферация, активация, персистенция, продуцирование цитокинов и активность *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления иммунный рецептор представляет собой не встречающийся в природе иммунный рецептор (*например*, CAR или рекомбинантный TCR). В некоторых вариантах осуществления иммунный рецептор представляет собой встречающийся в природе иммунный рецептор (*например*, нативный TCR). В одном варианте осуществления NF-κB стимулирующая молекула коэкспрессируется с CAR первого поколения, второго поколения, CAR третьего поколения, TFP, AbTCR или SIR. Как упомянуто выше, NF-κB стимулирующая молекула может быть, но предпочтительно, не связана с основной цепью CAR, TCR или SIR. Кроме того, в определенных вариантах осуществления, CAR по данному изобретению не включает домен CD28 или 41BB и необязательно включает домен CD3.

[00250] В одном варианте осуществления, данное раскрытие демонстрирует, что экспрессия селективного NF-κB активатора улучшает функции иммунных клеток (*например*, T клеток, дендритных клеток, CAR-T клеток или TCR-T клеток и *т.д.*), такие как выживание, размножение, пролиферацию, активацию, персистенцию, выработку цитокинов и активность *in vivo*. Селективный активатор NF-κB, как описано в данном документе, относится к агенту, который избирательно активирует путь передачи сигналов NF-κB без или с минимальной активацией других путей передачи сигналов. В одном варианте осуществления селективный активатор NF-κB активирует сигнальный путь NF-κB без или с минимальной активацией одного или большего количества сигнальных путей, выбранных из группы AKT, PI3K, JNK, p38 киназы, ERK, JAK/STAT и передачи сигналов интерферона пути. В данной области известен ряд способов измерения активации сигнальных путей NF-κB, AKT, PI3K, JNK, p38 киназы, ERK, JAK/STAT и

интерферона. Эти анализы могут быть применены в способах по данному изобретению либо по отдельности, либо в комбинации для идентификации селективных активаторов пути NF-κB.

[00251] В одном варианте осуществления селективный активатор NF-κB вызывает увеличение активности NF-κB более чем на 20% (*например, более чем на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%*), как измерено с помощью антитела Phospho-NF-κB p65 (Ser536) (Cell Signaling Technology; Данверс, Массачусетс), но увеличение активности пути АКТ менее чем на 20%, как измерено с помощью антитела Phospho-Akt (Ser473) (Cell Signaling Technology; Данверс, Массачусетс) при воздействии или экспрессии в тестируемой Т-клетке человека по сравнению с контрольной Т-клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления селективный активатор NF-κB вызывает увеличение активности NF-κB более чем на 20% (*например, более чем на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%*), как измерено с помощью антитела Phospho-NF-κB p65 (Ser536) (Cell Signaling Technology; Данверс, Массачусетс), но увеличение активности пути JNK менее чем на 20%, как измерено с помощью антитела Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (*например, клон G9; Cell Signaling Technology; Данверс, Массачусетс*) при воздействии или экспрессии в тестируемой Т-клетке человека по сравнению с контрольной Т-клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления селективный активатор NF-κB вызывает увеличение активности NF-κB более чем на 20% (*например, более чем на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%*), как измерено с помощью антитела Phospho-NF-κB p65 (Ser536) (Cell Signaling Technology; Данверс, Массачусетс), но увеличение активности пути киназы p38 менее чем на 20%, как измерено с помощью антитела MAPK Phospho-p38 (Thr180/Tyr182) (*например, клон D3F9; Cell Signaling Technology; Данверс, Массачусетс*) при воздействии или экспрессии в тестируемой Т-клетке человека по сравнению с контрольной Т-клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления селективный активатор NF-κB вызывает увеличение активности NF-κB более чем на 20% (*например, более чем на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%*), как измерено с помощью антитела Phospho-NF-κB p65 (Ser536) (Cell Signaling Technology; Данверс, Массачусетс), но увеличение активности пути STAT менее чем на 20%, как измерено с помощью антитела Phospho-Stat1 (Tyr701) (*например, клон D4A7, Cell Signaling Technology; Данверс, Массачусетс*) при воздействии или экспрессии в тестируемой Т-клетке человека по сравнению с контрольной Т-клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления селективный активатор NF-κB вызывает увеличение активности NF-κB более чем на 20% (*например, более чем на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%*), как измерено с помощью антитела Phospho-NF-κB p65 (Ser536) (Cell Signaling Technology; Данверс, Массачусетс), но увеличение активности пути STAT менее чем на 20% измерено с использованием антитела Phospho-Stat2 (Tyr690) (Cell Signaling Technology; Данверс, Массачусетс) при воздействии или экспрессии в тестируемой Т-клетке человека по сравнению с контрольной Т-клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления селективный активатор NF-κB вызывает увеличение активности NF-κB более чем на 20%

(например, более чем на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%), как измерено с помощью антитела Phospho-NF-κB p65 (Ser536) (Cell Signaling Technology; Данверс, Массачусетс), но увеличение активности пути STAT менее чем на 20%, как измерено с помощью антитела Phospho-Stat3 (Tyr705) (например, клон D3A7; Cell Signaling Technology; Данверс, Массачусетс) при воздействии или экспрессии в тестируемой Т-клетке человека по сравнению с контрольной Т-клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления селективный активатор NF-κB вызывает увеличение активности NF-κB более чем на 20% (например, более чем на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%), как измерено с помощью антитела Phospho-NF-κB p65 (Ser536) (Cell Signaling Technology; Данверс, Массачусетс), но увеличение активности пути STAT менее чем на 20%, как измерено с помощью антитела Phospho-Stat5 (Tyr694) (например, клон D47E7; Cell Signaling Technology; Данверс, Массачусетс) при воздействии или экспрессии в тестируемой Т-клетке человека по сравнению с контрольной Т-клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления селективный активатор NF-κB вызывает увеличение активности NF-κB более чем на 20% (например, более чем на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%), как измерено с помощью антитела Phospho-NF-κB p65 (Ser536) (Cell Signaling Technology; Данверс, Массачусетс), но увеличение активности пути ERK менее чем на 20%, как измерено с помощью Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (например, клон D13.14.4E; Cell Signaling Technology; Данверс, Массачусетс) при воздействии или экспрессии в тестируемой Т-клетке человека по сравнению с контрольной Т-клеткой человека.

[00252] В одном варианте осуществления селективный активатор NF-κB индуцирует повышение активности NF-κB более чем на 20% (например, более чем на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%), как измерено субъединицей антитела Phospho-IκB (Ser32) (например, клон 14D4, Cell Signaling Technology; Данверс, Массачусетс), но увеличение активности пути АКТ менее чем на 20%, как измерено с помощью антитела Phospho-Akt (Ser473) (Cell Signalling Technology; Данверс, Массачусетс) при воздействии или экспрессии в тестируемой Т клетке человека по сравнению с контрольной Т клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления селективный активатор NF-κB вызывает увеличение активности NF-κB более чем на 20% (например, более чем на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%), как измерено с помощью антитела к Phospho-IκBα (Ser32) (например, клон 14D4, Cell Signaling Technology; Данверс, Массачусетс), но увеличение активности пути JNK менее чем на 20%, как измерено с помощью антитела Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (например, клон G9; Cell Signaling Technology; Данверс, Массачусетс) при воздействии или экспрессии в тестируемой Т клетке человека по сравнению с контрольной Т клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления селективный активатор NF-κB вызывает увеличение активности NF-κB более чем на 20% (например, более чем на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%), как измерено с помощью антитела к Phospho-IκBα (Ser32) (например, клон 14D4, Cell Signaling Technology; Данверс, Массачусетс), но увеличение активности пути киназы p38 менее чем

на 20%, как измерено с помощью МАРК Phospho-p38 (Thr180/Tyr182) антитело (*например*, клон D3F9; Cell Signaling Technology; Данверс, Массачусетс) при воздействии или экспрессии в тестируемой Т-клетке человека по сравнению с контрольной Т-клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления селективный активатор NF-κB вызывает увеличение активности NF-κB более чем на 20% (*например, более чем на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%*), как измерено с помощью антитела Phospho-IκBα (Ser32) (*например*, клон 14D4, Cell Signaling Technology; Данверс, Массачусетс), но увеличение активности пути STAT менее чем на 20%, как измерено с помощью антитела Phospho-Stat1 (Tyr701) (*например*, клон D4A7; Cell Signaling Technology; Данверс, Массачусетс) при воздействии или экспрессии в тестируемой Т клетке человека по сравнению с контрольной Т клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления селективный активатор NF-κB вызывает увеличение активности NF-κB более чем на 20% (*например, более чем на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%*), как измерено с помощью антитела Phospho-IκBα (Ser32) (*например*, клон 14D4, Cell Signaling Technology; Данверс, Массачусетс), но увеличение активности пути STAT менее чем на 20% измерено с использованием антитела Phospho-Stat2 (Tyr690) (Cell Signaling Technology; Данверс, Массачусетс) при воздействии или экспрессии в тестируемой Т клетке человека по сравнению с контрольной Т клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления селективный активатор NF-κB вызывает увеличение активности NF-κB более чем на 20% (*например, более чем на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%*), как измерено с помощью антитела Phospho-IκBα (Ser32) (*например*, клон 14D4, Cell Signaling Technology; Данверс, Массачусетс), но увеличение активности пути STAT менее чем на 20%, как измерено с помощью антитела Phospho-Stat3 (Tyr705) (*например*, клон D3A7, Cell Signaling Technology; Данверс, Массачусетс) при воздействии или экспрессии в тестируемой Т клетке человека по сравнению с контрольной Т клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления селективный активатор NF-κB вызывает увеличение активности NF-κB более чем на 20% (*например, более чем на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%*), как измерено с помощью антитела Phospho-IκBα (Ser32) (*например*, клон 14D4, Cell Signaling Technology; Данверс, Массачусетс), но увеличение активности пути STAT менее чем на 20% измерено с использованием антитела Phospho-Stat5 (Tyr694) (*например*, клон D47E7, Cell Signaling Technology; Данверс, Массачусетс) при воздействии или экспрессии в тестируемой Т клетке человека по сравнению с контрольной Т клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления селективный активатор NF-κB вызывает увеличение активности NF-κB более чем на 20% (*например, более чем на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%*), как измерено с помощью антитела к Phospho-IκBα (Ser32) (*например*, клон 14D4, Cell Signaling Technology; Данверс, Массачусетс), но увеличение активности пути ERK менее чем на 20%, как измерено с помощью Phospho-p44/42 МАРК (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (*например*, клон D13.14.4E, Cell Signaling Technology; Данверс, Массачусетс) при воздействии или экспрессии в тестируемой Т клетке человека по сравнению с контрольной Т клеткой человека.

[00253] В данной области известны альтернативные способы измерения активации сигнальных путей NF-κB, AKT, JNK, p38, ERK, JAK/STAT и интерферона, и их можно использовать для идентификации селективного активатора сигнального пути NF-κB. Например, селективный активатор NF-κB индуцирует большее увеличение активности связывания ДНК NF-κB при воздействии или экспрессии в клетке-мишени (*например*, в Т-клетке или клетке 293FT) по сравнению с увеличением ДНК-связывающей активности c-Jun, c-Fos, JunD, ATF2, STAT3, NFAT1c, ELK-1, CREB, IRF3 или IRF7. Наборы для измерения ДНК-связывающих активностей различных факторов транскрипции, принадлежащих к различным сигнальным путям, коммерчески доступны (*например*, TransAM[®] Transcription Factor Assays; Active Motif) и могут использоваться для идентификации селективного активатора сигнального пути NF-κB.

[00254] В одном варианте осуществления селективный активатор NF-κB индуцирует большее увеличение соотношения увеличения фосфорилирования IκB к увеличению фосфорилирования AKT по сравнению с CD28, когда и тот и другой экспрессируются в Т клетках человека или когда передача сигналов через и тот и другой активируется в Т клетках человека в сопоставимых условиях. В одном варианте осуществления селективный активатор NF-κB вызывает большее кратное увеличение в соотношении увеличения фосфорилирования IκB к увеличению фосфорилирования AKT по сравнению с 41BB, когда и тот и другой экспрессируются в Т клетках человека в сопоставимых условиях или когда передача сигналов через и тот и другой активируется в Т клетках человека в сопоставимых условиях. В одном варианте осуществления селективный активатор NF-κB, когда он совместно экспрессируется с CAR 1-го поколения, в котором отсутствует костимуляторный домен, вызывает большее увеличение отношения увеличения фосфорилирования IκBα к увеличению фосфорилирования AKT по сравнению с CAR 2-го поколения, CAR содержащим костимуляторный домен CD28, когда и тот и другой экспрессируются в Т клетках человека и подвергаются воздействию целевых антиген-содержащих клеток в сопоставимых условиях. В одном варианте осуществления селективный активатор NF-κB, когда он совместно экспрессируется с CAR 1-го поколения, в котором отсутствует костимуляторный домен (*например*, CAR, представленный SEQ ID NO: 1016), индуцирует большее увеличение отношения увеличения фосфорилирования IκBα для увеличения в фосфорилировании AKT по сравнению с CAR 2-го поколения, содержащим костимуляторный домен 41BB (*например*, CAR, представленный SEQ ID NO: 1318), когда и тот и другой экспрессируются в Т-клетках человека и подвергаются воздействию целевых антиген-содержащих клеток (*например*, RAJI) в сопоставимых условиях. Например, Т-клетки, экспрессирующие CD19-нацеленный CAR первого поколения, совместно экспрессирующие K13 (CD8SP-FMC63- (vL-vH) -Myc-z-P2A-K13-Flag-T2A-PAC; SEQ ID NO: 1016) демонстрируют большее увеличение соотношения фосфорилирования IκBα к фосфорилированию AKT по сравнению с Т клетками, экспрессирующими CD19-нацеленный CAR 2-го поколения с костимуляторным доменом 41BB (CD8SP-FMC63- (vL-vH) -Myc-BBz-T2A-PAC; SEQ ID

NO : 1318) когда обе клетки CAR-T подвергаются воздействию клеток RAJI при соотношении E:T 1:5 в течение 1-24 часов. Фосфорилирование IкВ α и АКТ рассчитывают с использованием методов, известных в данной области (*например*, иммуноблоттинг или проточная цитометрия), с использованием антител, специфичных к их фосфорилированным формам. Увеличение фосфорилирования IкВ α рассчитывают путем вычитания фосфорилирования IкВ α в контрольных Т клетках, у которых отсутствует экспрессия CAR, из фосфорилирования IкВ α в клетках CAR-T после воздействия клеток RAJI. Увеличение фосфорилирования АКТ рассчитывают путем вычитания фосфорилирования АКТ в контрольных Т-клетках, у которых отсутствует экспрессия CAR из фосфорилирования АКТ в клетках CAR-T после воздействия клеток RAJI. Отношение увеличения IкВ α к увеличению фосфорилирования АКТ рассчитывают путем деления увеличения фосфорилирования IкВ α на увеличения фосфорилирования АКТ.

[00255] В одном варианте осуществления, селективный NF-кВ активатор индуцирует большее увеличение отношения увеличения фосфорилирования p65/RelA к увеличению фосфорилирования АКТ, по сравнению с CD28, когда и тот и другой из них экспрессированы в Т клетках человека или в случае активации передачи сигналов через и тот и другой в человеческих Т клетках в сопоставимых условиях. В одном варианте осуществления селективный активатор NF-кВ вызывает большее кратное увеличение соотношения увеличения фосфорилирования p65/RelA к увеличению фосфорилирования АКТ по сравнению с 41BB, когда и тот и другой экспрессируются в Т клетках человека в сопоставимых условиях или в случае активации передачи сигналов через и тот и другой в Т клетках человека в сопоставимых условиях. В одном из вариантов осуществления селективный активатор NF-кВ при совместной экспрессии с CAR 1-го поколения, в котором отсутствует костимуляторный домен, вызывает большее увеличение отношения увеличения фосфорилирования p65/RelA к увеличению фосфорилирования АКТ по сравнению с CAR 2-го поколения содержащего костимуляторный домен CD28, когда и тот и другой экспрессируются в Т клетках человека и подвергаются воздействию антигенсодержащих клеток-мишеней в сопоставимых условиях. В одном варианте осуществления селективный активатор NF-кВ, когда он совместно экспрессируется с CAR 1-го поколения, в котором отсутствует костимуляторный домен (*например*, CAR, представленный SEQ ID NO: 1016), вызывает большее увеличение отношения увеличения фосфорилирования p65/RelA к увеличению фосфорилирования АКТ по сравнению с CAR 2-го поколения, содержащего костимуляторный домен 41BB (*например*, CAR, представленный SEQ ID NO: 1318), когда и тот и другой экспрессируются в Т-клетках человека и подвергаются воздействию целевых антиген-содержащих клеток (*например*, RAJI) в сопоставимых условиях. Например, Т-клетки, экспрессирующие CD19-нацеленный CAR первого поколения, совместно экспрессирующие K13 (CD8SP-FMC63-(vL-vH) -Myc-z-P2A-K13-Flag-T2A-PAC; SEQ ID NO: 1016) демонстрируют большее увеличение соотношения фосфорилирования p65/RelA к фосфорилированию АКТ по сравнению с Т клетками, экспрессирующими CD19-нацеленный CAR 2-го поколения с

костимуляторным доменом 41BB (CD8SP-FMC63- (vL-vH) -Myc-BBz-T2A-PAC; SEQ ID NO: 1318) когда и те и другие клетки CAR-T подвергаются воздействию клеток RAJI при соотношении эффектор:мишень (E: T) 1:5 в течение 1-24 часов (*например*, 1 час, 2 часа, 4 часа, 12 часов или 24 часа). Фосфорилирование p65/RelA и АКТ рассчитывают с использованием способов, известных в данной области (*например*, иммуноблоттинг или проточная цитометрия), с использованием антител, специфичных к их фосфорилированным формам. Увеличение фосфорилирования p65/RelA рассчитывают путем вычитания фосфорилирования p65/RelA в контрольных T клетках, у которых отсутствует экспрессия CAR, из фосфорилирования p65/RelA в клетках CAR-T после того, как и те и другие подвергаются воздействию клеток RAJI. Увеличение фосфорилирования АКТ рассчитывают путем вычитания фосфорилирования АКТ в контрольных T-клетках, у которых отсутствует экспрессия CAR, из фосфорилирования АКТ в клетках CAR-T после того, как и те и другие подвергаются воздействию клеток RAJI. Отношение увеличения p65/RelA к увеличению фосфорилирования АКТ рассчитывают путем деления увеличения фосфорилирования p65/RelA на увеличение фосфорилирования АКТ.

[00256] В одном варианте осуществления селективный активатор NF-κB, когда он совместно экспрессируется с CAR 1-го поколения, в котором отсутствует костимуляторный домен (*например*, CAR, представленный SEQ ID NO: 1016), индуцирует большее увеличение отношения увеличения фосфорилирования IκBα к увеличению фосфорилирования киназ JNK, ERK или p38 по сравнению с CAR 2-го поколения, содержащим костимуляторный домен 41BB (*например*, CAR, представленный SEQ ID NO: 1318), когда и тот и другой экспрессируются в T клетках человека и подвергаются действию антиген-мишень-содержащих клеток (*например*, RAJI) в течение соответствующего интервала времени (*например*, 1-24 часа) в сопоставимых условиях. В одном варианте осуществления селективный активатор NF-κB, когда он совместно экспрессируется с CAR 1-го поколения, в котором отсутствует костимуляторный домен (*например*, CAR, представленный SEQ ID NO: 1016), вызывает большее увеличение отношения увеличения фосфорилирования p65/RelA к увеличению фосфорилирования киназ JNK, ERK или p38 по сравнению с CAR 2-го поколения, содержащим костимуляторный домен 41BB (*например*, CAR, представленный SEQ ID NO: 1318), когда они и экспрессируются в T клетках человека и подвергаются воздействию клетки-мишени, содержащей антиген (*например*, RAJI), в течение соответствующего интервала времени (*например*, 1-24 часа) в сопоставимых условиях.

[00257] В одном варианте осуществления данного изобретения активатор NF-κB, в том числе селективный активатор NF-κB, представляет собой не встречающуюся в природе субстанцию и экспрессируется в клетке экзогенно. В одном варианте осуществления селективный активатор NF-κB имеет вирусное происхождение, *т. е.*, он кодируется вирусом или является производным от вирусно кодируемого белка или имеет домен из более чем 10 аминокислотных остатков (*например*, из более чем 15 аминокислотных остатков, 20 аминокислотных остатков, 30 аминокислотных остатков

или 50 аминокислотных остатков), с более чем 80% (*например*, более чем 85%, 90%, 95% или 99%) идентичности с одним или большим количеством вирусных белков. Иллюстративным селективным активатором NF-κB вирусного происхождения является vFLIP K13 (SEQ ID NO:), полученный из герпесвируса, ассоциированного с саркомой Капоши. В другом варианте осуществления селективный активатор NF-κB происходит из млекопитающих или клеток. Иллюстративными селективными активаторами NF-κB, происходящими из млекопитающих являются мутант NEMO-K277A человека, мутант NEMO-K277-deltaV249-K255 человека, мутант NEMO-K270A мыши, IKK2-S177E-S181E и IKK1-S176E-S180E. В другом варианте осуществления селективный активатор NF-κB имеет человеческое происхождение; *т.е.* он имеет домен из более чем 10 аминокислотных остатков (*например*, из более чем 15 аминокислотных остатков, 20 аминокислотных остатков, 30 аминокислотных остатков или 50 аминокислотных остатков) с более чем 80% (*например*, более чем 85%, 90%, 95% или 99%) идентичности с одним или большим количеством белков человека. В некоторых вариантах осуществления селективный активатор NF-κB состоит из двух или более слитых белков (*например*, FKBPx2-NEMO). В некоторых вариантах осуществления два или более партнера по слиянию селективного активатора NF-κB каждый получен из белков человека или имеет более 80% идентичности с белками человека.

[00258] В некоторых вариантах осуществления селективный NF-κB активатор кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты дикого типа, в то время как в других вариантах осуществления селективный активатор NF-κB кодируется кодон-оптимизированной или мутантной последовательностью нуклеиновой кислоты. В иллюстративном варианте осуществления vFLIP K13 кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, кодоно-оптимизированной для человека, *например*, K13-opt (SEQ ID NO: 7768).

[00259] В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки экспрессируют один селективный активатор NF-κB, тогда как в других вариантах осуществления иммунные клетки экспрессируют более одного селективного активатора NF-κB (*например*, NEMO-K277A плюс K13-opt или IKK2-S177E-S181E плюс IKK1 -S176E-S180E).

[00260] В некоторых вариантах осуществления селективный активатор NF-κB экспрессируется в иммунной клетке конститутивным образом. В других вариантах осуществления селективный активатор NF-κB экспрессируется в иммунной клетке индуцибельным образом. В иллюстративном варианте осуществления, индуцируемой экспрессии селективного NF-κB активатора может быть достигнуто за счет использования индуцируемого промотора. Примеры индуцибельных промоторов включают, но не ограничиваются ими, индуцируемый металлотионином промотор, индуцируемый глюкокортикоидами промотор, индуцируемый прогестероном промотор и индуцируемый тетрациклином промотор. Система RheoSwitch[®] представляет собой другую платформу регулятора транскрипции для контроля экспрессии белка.

[00261] Способы контроля активности белков известны в данной области и могут быть применены для контроля активности активатора NF-κB, включая селективный активатор NF-κB. В иллюстративном варианте осуществления это включает экспрессию в клетке-мишени, такой как Т клетка или НК-клетка, мутанта NEMO или NEMO, слитого с доменом димеризации или доменом-переключателем. В иллюстративном варианте осуществления домен-переключатель содержит одну или большее количество копий домена FKBP12 или домена FKBP12v36. В некоторых вариантах осуществления домен-переключатель присоединен к карбокси-концу активатора NF-κB (*например*, NEMO), тогда как в других вариантах осуществления домен-переключатель присоединен к аминоконцу активатора NF-κB (*например*, NEMO). Воздействие на клетки-мишени, экспрессирующие такой слитый белок, подходящим димеризатором (*например*, римидуцидом) приводит к олигомеризации NEMO, что, в свою очередь, приводит к активации NF-κB. В альтернативном варианте осуществления активность селективных активаторов NF-κB также можно контролировать путем слияния их с лигандсвязывающим доменом мутированного рецептора эстрогена, как было описано (Matta H et al., Journal of Biological Chemistry, 282, 34, 2007). Мутированный рецептор эстрогена не связывается с физиологическим лигандом эстрогена, но связывается с очень высокой аффинностью с синтетическим лигандом 4-ОНТ (4-гидрокситамоксифеном) и регулирует активность партнера по слиянию (*например*, активатора NF-κB, *например*, vFLIP K13 или NEMO) 4-ОНТ-зависимым способом.

[00262] В некоторых вариантах осуществления селективный активатор NF-κB экспрессируется в иммунных клетках путем изменения его геномной копии с использованием методов редактирования генов, известных в данной области. В иллюстративном варианте осуществления система редактирования генов (*например*, TALON, нуклеаза Zn-пальца или CRISPR/Cas9) используется для преобразования одного или обоих аллелей человеческого NEMO в человеческую мутантную форму NEMO-K277A. В другом примере варианта осуществления система редактирования генов используется для преобразования одного или обоих аллелей человеческого NEMO в человеческую мутантную форму NEMO-K277A-delta-V249-K255. Последовательность конструкций, нацеленных на ген NEMO человека, которые можно использовать для индукции мутаций K277A и K277A-delta-V249-K255, представлены в SEQ ID NO: 7771 и 7772, соответственно. Эти последовательности могут быть клонированы в подходящем векторе (*например*, дефектном по интеграции лентивирусном векторе, AAV-векторе или аденовирусном векторе). Примеры геномных последовательностей-мишеней для NEMO человека, для которых могут быть получены нРНК CRISPR/Cas9, содержащие комплементарные последовательности нацеливания, представлены в SEQ ID NO: 7759-7762. Последовательности нРНК клонируют в вектор pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (Addgene). Альтернативно, последовательности кРНК могут быть клонированы в векторе pLenti-CRISPR-v2, доступном от Addgene (плазмида № 52961), и следуя инструкциям, предоставленным поставщиком. Введение нацеливающей конструкции

NEMO и конструкций, кодирующих нРНК, в Т клетки осуществляют, как описано ранее (Knipping F et al., Molecular Therapy: Methods & Clinical Development, Vol. 4, 2017).

[00263] В другом или дополнительном варианте осуществления любого из вышеупомянутых вариантов осуществления, описанных в данном документе, иммунные эффекторный клетки, которые экспрессируют вспомогательный модуль, кодирующий селективный активатор NF-κB (*например*, hNEMO-K277A, hNEMO-K277A-deltaV249-K555, mNEMO-K270A, K13-opt, IKK2-S177E-S181E или IKK1-S176E-S180E) демонстрируют улучшение активности *in vitro* (*например*, антиген - мишень индуцированной продукции IL2, пролиферации, размножения и задержки в терминальной дифференцировки, задержка в старение и *т.д.*) против клетки-мишени, экспрессирующей антиген, по сравнению с соответствующей иммунной эффекторной клеткой, лишенной вспомогательного модуля, в аналогичных условиях. Активацию NF-κB в иммунных эффекторных клетках измеряют с использованием методов, известных в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, измерение фосфорилированного IκBα, фосфорилированного p65, общего IκBα, транслокации p65 в ядро, активации генов, реагирующих на NF-κB, анализ изменения электрофоретической подвижности (EMSA) и репортерного анализ на основе NF-κB *и т. д.* В некоторых вариантах осуществления селективную активацию NF-κB определяют путем измерения кратного увеличения активации NF-κB в иммунных эффекторных клетках по сравнению с кратным увеличением активации пути АКТ. В некоторых вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки, которые экспрессируют вспомогательный модуль, кодирующий селективный активатор NF-κB (*например*, K13-opt (K13 кодон-оптимизированный для человека) или hNEMO-K277A), демонстрируют более высокую активность *in vitro* (*например*, индуцированную антигеном-мишенью продукцию IL2, пролиферацию, размножение, задержку терминальной дифференцировки и задержку старения) в направлении клеток-мишеней, экспрессирующих антиген, по сравнению с соответствующими иммунными эффекторными клетками, у которых отсутствует экспрессия вспомогательного модуля, кодирующего селективный активатор NF-κB (*например*, K13-opt или hNEMO-K277A), когда и тот и другой тестируются в одинаковых экспериментальных условиях. В иллюстративных вариантах осуществления CD19-CAR-экспрессирующие иммунные эффекторные клетки, которые экспрессируют вспомогательный модуль, кодирующий селективный активатор NF-κB (*например*, K13-opt (K13 кодон-оптимизированный для человека) или hNEMO-K277A), демонстрируют более высокую активность *in vitro* (*например*, антиген-мишень индуцированную продукцию IL2, пролиферацию, размножение, задержку терминальной дифференцировки и задержку старения) к клеткам Nalm6 по сравнению с соответствующими CD19-CAR-экспрессирующими эффекторными клетками, которые не экспрессируют вспомогательный модуль, кодирующий селективный активатор NF-κB (*например*, K13-opt или hNEMO-K277A), когда и тот и другой тестируются в одинаковых условиях эксперимента. В некоторых вариантах осуществления *in vitro* активность (*например*,

индуцированная антигеном-мишенью продукция IL2, пролиферация, размножение, задержка терминальной дифференцировки и задержка старения) иммунных эффекторных клеток, которые экспрессируют вспомогательный модуль, кодирующий селективный активатор NF-κB, против целевых антиген-экспрессирующих клеток (*т.е.* клеток-мишеней) по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% или 100% больше, чем активность *in vitro* соответствующих иммунных эффекторных клеток, которые не экспрессируют вспомогательный модуль, кодирующий селективный активатор NF-κB. В некоторых вариантах осуществления *in vitro* активность (*например*, индуцированная антигеном-мишенью продукция IL2, пролиферация, размножение, задержка терминальной дифференцировки и задержка старения) иммунных эффекторных клеток, которые экспрессируют селективный активатор NF-κB (*например*, hNEMO-K277A) против целевых антиген-экспрессирующих клеток (*т. е.* клеток-мишеней) по меньшей мере в 1,25 раза, в 1,5 раза, в 2 раза, в 5 раз или в 10 раз больше, чем *in vitro*-активность соответствующих иммуноэффекторных клеток, в которых отсутствует экспрессия селективного активатора NF-κB. В одном варианте осуществления иммунные эффекторные Т-клетки (*например*, CD19-CAR-Т-клетки), которые экспрессируют селективный активатор NF-κB, продуцируют по меньшей мере, на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% или 100% больше IL2 при воздействии на целевую антиген-экспрессирующую клетку (*например*, клетки Nalm-6) по сравнению с контрольными иммунными эффекторными Т клетками (*например*, клетками CD19-CAR-Т), в которых отсутствует экспрессия селективного активатора NF-κB. В одном варианте осуществления иммунные эффекторные Т клетки (*например*, CD19-CAR-Т-клетки), которые экспрессируют селективный активатор NF-κB, демонстрируют по меньшей мере, на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% или 100% больше пролиферации при воздействии на целевую антиген-экспрессирующую клетку (*например*, клетку Nalm-6) по сравнению с контрольными иммунными эффекторными Т клетками (*например*, клетками CAR-Т), в которых отсутствует экспрессия селективного активатора NF-κB. В одном варианте осуществления иммунные эффекторные Т клетки (*например*, CD19-CAR-Т-клетки), которые экспрессируют селективный активатор NF-κB, демонстрируют по меньшей мере, на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% или 100% меньше маркеров истощения при воздействии на целевую антиген-экспрессирующую клетку (*например*, клетку Nalm-6) по сравнению с контрольными иммунными эффекторными Т клетками (*например*, клетками CAR-Т), в которых отсутствует экспрессия селективного активатора NF-κB. В одном варианте осуществления иммунные эффекторные Т клетки (*например*, CD19-CAR-Т-клетки), которые экспрессируют селективный активатор NF-κB, демонстрируют по меньшей мере, на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% или 100% меньше маркеров терминальной дифференцировки при воздействии на клетку, экспрессирующую антиген-мишень (*например*, клетки Nalm-6), по сравнению с контрольными иммунными эффекторными Т клетками (*например*, клетками CAR-Т), в которых отсутствует экспрессия селективного активатора NF-κB. В одном варианте осуществления иммунные эффекторные Т клетки

(например, CD19-CAR-T-клетки), которые экспрессируют селективный активатор NF-κB, демонстрируют по меньшей мере, на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% или 100% больше цитотоксичности при серийном воздействии на клетки-мишени, экспрессирующие антиген (например, клетки Nalm-6) в течение 3-4 недель, по сравнению с контрольными иммунными эффекторными Т клетками (например, клетками CAR-T), в которых отсутствует экспрессия селективного NF-κB активатор. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка, которая экспрессирует вспомогательный модуль, кодирующий селективный активатор NF-κB, представляет собой Т-клетку (например, CD8 Т-клетку, CD4 Т-клетку, CAR-T-клетку, TIL, TREG-клетку, NKT-клетку), NK-клетку (например, CAR-NK-клетку), макрофаг (например, CAR-экспрессирующий макрофаг), антигенпрезентирующую клетку (например, дендритную клетку), стволовую клетку, индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC) или стволовую клетку, которая может давать начало иммунной эффекторной клетке.

[00264] В другом или дополнительном варианте осуществления любого из указанных выше вариантов осуществления, описанных в данном документе, иммунные эффекторные клетки, которые экспрессируют вспомогательный модуль, кодирующий селективный NF-κB активатор, демонстрируют выше активность *in vivo* (например, *in vivo* размножение, *in vivo* сохранение состояния, уменьшение опухоли, снижение значения биolumинесценции, полученной из-за люциферазы, экспрессируемой опухолью или выживание животного) против клетки-мишени, экспрессирующей антиген, по сравнению с контрольными иммунными эффекторными клетками, которые не экспрессируют вспомогательный модуль, кодирующий селективный активатор NF-κB, когда и те и другие тестируются в одинаковых условиях. Активация NF-κB в иммунных эффекторных клетках измеряется с использованием методов, известных в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, измерение фосфорилированного IκBα, общего IκBα, транслокации p65 в ядро, активацию генов, реагирующих на NF-κB, анализ изменения электрофоретической подвижности (EMSA) и репортерный анализ на основе NF-κB *и т. д.* В некоторых вариантах осуществления селективную активацию NF-κB определяют путем измерения кратного увеличения активации NF-κB в иммунных эффекторных клетках по сравнению с кратным увеличением активации пути АКТ. Например, в некоторых вариантах осуществления CD19-CAR-экспрессирующие иммунные эффекторные клетки, которые экспрессируют вспомогательный модуль, кодирующий селективный активатор NF-κB (например, K13-opt (K13 кодон-оптимизированный для человека) или hNEMO-K277A), проявляют более высокую активность *in vivo* (например, *размножение in vivo*, *устойчивость in vivo*, *уменьшение опухоли*, *уменьшение величины биolumинесценции, полученной из FLuc экспрессирующей опухоли или выживание животных*) по отношению к клеткам Nalm6-FLuc в модели ксенотрансплантата NSG мыши по сравнению с соответствующими CD19-CAR-экспрессирующими эффекторными клетками, которые не имеют вспомогательного модуля, кодирующего селективный активатор NF-κB (например, K13-opt (K13 кодоном-оптимизированный для человека) или hNEMO-K277A) при

тестировании в аналогичных условиях эксперимента. В некоторых вариантах осуществления активности *in vivo* (*например, размножение in vivo, устойчивость in vivo, уменьшение опухоли, уменьшение величины биоломинесценции, полученной из FLuc экспрессирующей опухоли или выживания животных*) иммунных эффекторных клеток (*например, CD19-CAR-T клеток*) которые экспрессируют вспомогательный модуль, кодирующий селективный активатор NF-κB, против целевых антиген-экспрессирующих клеток (*например, Nalm-6*) в модели ксенотрансплантата мыши NSG, составляет по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% или 100% больше, чем активность *in vivo* соответствующих иммунных эффекторных клеток, в которых отсутствует вспомогательный модуль, кодирующий селективный активатор NF-κB. В некоторых вариантах осуществления активности *in vivo* (*например, размножение in vivo, устойчивость in vivo, уменьшение опухоли, уменьшение величины биоломинесценции, полученной из FLuc экспрессирующей опухоли или выживания животных*) иммунных эффекторных клеток (*например, CD19-CAR-T клеток*) которые кодируют вспомогательный модуль, кодирующий селективный активатор NF-κB, против целевых антиген-экспрессирующих клеток (*например, Nalm6*) в модели ксенотрансплантата мыши NSG по меньшей мере в 1,25 раза, в 1,5 раза, в 2 раза, в 5 раз или в 10 раз больше, чем активность *in vivo* соответствующих иммунных эффекторных клеток, у которых отсутствует экспрессия вспомогательного модуля, кодирующего селективный активатор NF-κB. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка, экспрессирующая вспомогательный модуль, кодирующий селективный активатор NF-κB, представляет собой T-клетку (*например, CD8 T-клетку, CD4 T-клетку, CAR-T-клетку, TIL, TREG-клетку, NKT-клетку*), NK-клетку (*например, CAR-NK-клетку*), макрофаг (*например, CAR-экспрессирующий макрофаг*), антигенпрезентирующую клетку (*например, дендритную клетку*), стволовую клетку, индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC) или стволовую клетку, которая может давать начало иммунной эффекторной клетке.

[00265] В другом или дополнительном варианте осуществления любого из предшествующих вариантов осуществления, описанных в данном документе, иммунные эффекторные клетки, экспрессирующие вспомогательный модуль, *например, hNEMO-K277A, hNEMO-K277A-deltaV249-K555, mNEMO-K270A, K13-opt, IKK2-S177E-S181E, IKK1-S176E-S180E или MyD88-L265P* демонстрируют повышенную *in vivo* активность (*например, размножение in vivo, устойчивость in vivo, уменьшение опухоли, уменьшение величины биоломинесценции, полученной из FLuc экспрессирующей опухоли или выживание животных*) против антиген-мишень-экспрессирующих клеток по сравнению с соответствующей иммунными эффекторными клетками, лишенными вспомогательного модуля при сравнении в аналогичных условиях. Например, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения, CD19-CAR-экспрессирующие иммунные эффекторные клетки, которые также коэкспрессируют hNEMO-K277A, hNEMO-K277A-deltaV249-K555, mNEMO-K270A, K13-opt, IKK2-S177E-S181E, IKK1-S176E-S180E или

MyD88-L265P демонстрируют повышенную *in vivo* активность (*например, размножение in vivo, устойчивость in vivo, уменьшение опухоли, уменьшение величины биoluminesценции, полученной из FLuc экспрессирующей опухоли или выживание животных*) по отношению к клеткам Nalm6-FLuc в ксенотрансплантате мыши NSG модели по сравнению с соответствующими CD19-CAR-экспрессирующими эффекторными клетками, у которых отсутствует экспрессия hNEMO-K277A при тестировании в аналогичных условиях эксперимента. В некоторых вариантах осуществления активность *in vivo* (*например, размножение in vivo, устойчивость in vivo, уменьшение опухоли, уменьшение величины биoluminesценции, полученной из FLuc экспрессирующей опухоли или выживание животных*) иммунных эффекторных клеток, экспрессирующих вспомогательный модуль, описанный в данном документе (*например, hNEMO -K277A, hNEMO-K277A-deltaV249-K555, mNEMO-K270A, K13-opt, IKK2-S177E-S181E, IKK1-S176E-S180E или MYD88-L265P*) против клеток, экспрессирующих антиген-мишень, (*т.е. клеток-мишеней*), в модели ксенотрансплантата мыши NSG по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% или 100% больше, чем активность *in vivo* соответствующей иммунной эффекторной клетки, в которой отсутствует экспрессия вспомогательного модуля. В некоторых вариантах осуществления активность *in vivo* (*например, размножение in vivo, устойчивость in vivo, уменьшение опухоли, уменьшение величины биoluminesценции, полученной из FLuc экспрессирующей опухоли или выживание животных*) иммунных эффекторных клеток, экспрессирующих вспомогательный модуль, описанным в данном документе (*например, hNEMO -K277A, hNEMO-K277A-deltaV249-K555, mNEMO-K270A, K13-opt, IKK2-S177E-S181E, IKK1-S176E-S180E или MYD88-L265P*) против клеток, экспрессирующих антиген-мишень, (*т.е. клеток-мишеней*), в модели ксенотрансплантата мыши NSG по меньшей мере в 1,25, 1,5, 2, 5 или 10 раз больше, чем активность *in vivo* соответствующей иммунной эффекторной клетки, в которой отсутствует экспрессия вспомогательного модуля. В некоторых вариантах осуществления эффекторная клетка, экспрессирующая вспомогательный модуль, представляет собой Т-клетку (*например, CD8 Т-клетку, CD4 Т-клетку, CAR-Т-клетку, Т1L, TREG-клетку, NKT-клетку*), NK-клетку (*например, CAR-NK-клетку*), макрофаг (*например, CAR-экспрессирующий макрофаг*), антигенпрезентирующую клетку (*например, дендритную клетку*), стволовую клетку, индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC) или стволовую клетку, которая может давать начало иммунной эффекторной клетке.

[00266] Данное раскрытие далее предусматривает, что экспрессия селективного активатора NF-κB может быть использована для улучшения секреции цитокинов, презентации антигена и иммунного ответа, генерируемого антигенпрезентирующими клетками, включая дендритные клетки. Данное раскрытие дополнительно обеспечивает способ повышения эффективности вакцины, включая противораковые вакцины, путем экспрессии селективного активатора NF-κB в антигенпрезентирующих клетках *ex vivo* или *in vivo*. В одном варианте осуществления использование селективных активаторов

NF-κB увеличивает продукцию цитокинов (*например*, TNFα) антигенпрезентирующими клетками (*например*, дендритными клетками) более чем на 15%.

[00267] Данное раскрытие дополнительно предусматривает, что вспомогательный модуль, кодирующий CMV-141 (SEQ ID NO: 7770), может быть экспрессирован в эффекторных клетках иммунной системы, *например*, Т-клетках, *например*, CAR-Т клетках или TCR-Т клетках, чтобы задержать их истощение и улучшить их стабильность в долгосрочной перспективе. CMV-141 может экспрессироваться в иммунных эффекторных клетках индуцибельным или конститутивным образом.

[00268] В некоторых вариантах осуществления, получают клетки, *например*, Т или NKT или стволовые клетки или iPCS или синтетические Т клетки, которые экспрессируют не встречающийся в природе иммунный рецептор, *например*, CAR, и/или NF-κB стимулирующие молекулы описанные в данном документе с применением комбинации вставки гена с использованием SBTS и генетического редактирования с использованием нуклеазы (*например*, нуклеазы цинкового пальца (ZFN), эффекторных нуклеаз, подобных активатору транскрипции (TALEN), системы CRISPR/Cas или сконструированной мегануклеазы, сконструированной хоуминг-эндонуклеазы).

[00269] В другом варианте осуществления данное изобретение раскрывает способ получения клетки (*например*, иммунной эффекторной клетки или ее популяции), включающий введение (*например*, трансдукцию) клетки, *например*, Т клетки, NKT-клетки или стволовых клеток или iPCS или синтетической Т клетки, описанных в данном документе, вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую не встречающийся в природе иммунный рецептор, *например*, CAR, и/или NF-κB стимулирующие молекулы.

[00270] В различных вариантах осуществления клетки для модификаций с использованием не встречающегося в природе иммунного рецептора и/или NF-κB стимулирующей молекулы, описанной в данном документе, включая Т клетки или NK-клетки, могут быть получены от субъекта, нуждающегося в терапии. Т клетки могут быть получены из ряда источников, включая мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатического узла, пуповинную кровь, ткань тимуса, ткань из места инфекции, асцит, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли. Т клетки могут быть тканевыми гамма-дельта-Т клетками, которые можно культивировать и размножить *in vitro* до экспрессии не встречающегося в природе иммунного рецептора, *например*, CAR, и/или NF-κB стимулирующей молекулы.

[00271] В одном варианте осуществления данное изобретение раскрывает ряд химерных антигенных рецепторов (CAR), содержащих антигенсвязывающий домен (*например*, антитело или фрагмент антитела, TCR или TCR-фрагмент), сконструированный для специфического связывания с ассоциированным с заболеванием антигеном, *например* опухолевым антигеном, как описано в данном документе. В одном варианте осуществления данное изобретение относится к иммунной эффекторной клетке (*например*, Т-клетке, NK-клетке), сконструированной для экспрессии не встречающегося в природе иммунного рецептора (*например*, CAR или рекомбинантного TCR) и/или NF-κB

стимулирующей молекулы, при этом сконструированная иммунная эффекторная клетка обладает терапевтической активностью. В одном варианте осуществления данное изобретение относится к иммунной эффекторной клетке (*например*, Т-клетке, НК-клетке), сконструированной для экспрессии не встречающегося в природе иммунного рецептора (*например*, CAR или рекомбинантного TCR) и/или NF-κB стимулирующей молекулы, при этом сконструированная иммунная эффекторная клетка проявляет противораковую или антиинфекционную (*например*, анти-HIV-1) активность. В некоторых вариантах осуществления NF-κB стимулирующая молекула может экспрессироваться в Т клетке (*например*, инфильтрирующем лимфоците опухоли или TIL) с ее эндогенным TCR, при этом сконструированная иммунная эффекторная клетка проявляет противоопухолевую или антиинфекционную (*например*, анти-HIV-1) активность. В одном варианте осуществления указанная клетка трансформируется не встречающимся в природе иммунным рецептором (*например*, CAR или рекомбинантным TCR) и NF-κB стимулирующей молекулой, и не встречающийся в природе иммунный рецептор экспрессируется на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления указанная клетка (*например*, Т-клетка, НК-клетка) трансдуцируется вирусным вектором, кодирующим не встречающийся в природе иммунный рецептор (*например*, CAR или рекомбинантный TCR) и/или NF-κB стимулирующую молекулу. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор. В некоторых таких вариантах осуществления указанная клетка может стабильно экспрессировать не встречающийся в природе иммунный рецептор (*например*, CAR или рекомбинантный TCR) и/или NF-κB стимулирующую молекулу. В другом варианте осуществления указанная клетка (*например*, Т-клетка, НК-клетка) трансфицируется нуклеиновой кислотой, *например*, мРНК, кДНК, ДНК, кодирующей не встречающийся в природе иммунный рецептор (*например*, CAR или рекомбинантный TCR) и/или NF-κB стимулирующую молекулу. В некоторых таких вариантах осуществления указанная клетка может временно экспрессировать не встречающийся в природе иммунный рецептор (*например*, CAR или рекомбинантный TCR) и/или NF-κB стимулирующую молекулу. В некоторых вариантах осуществления NF-κB стимулирующая молекула может экспрессироваться в Т клетке (*например*, в инфильтрирующем в опухоль лимфоците или TIL) с ее эндогенным TCR.

[00272] Данное раскрытие раскрывает иммунные эффекторные клетки (*например*, Т-клетки, НК-клетки), которые сконструированы так, чтобы содержать один или большее количество не встречающихся в природе иммунных рецепторов (*например*, CAR/TCR) и/или NF-κB стимулирующих молекул, которые направляют иммунные эффекторные клетки на патологические клетки или связанные с болезнью клетки, такие как раковые клетки. Это достигается с помощью антигенсвязывающего домена на иммунном рецепторе, который специфичен к ассоциированному с раком антигену. Существует два класса антигенов, ассоциированных с раком (опухолевые антигены), на которые могут

быть нацелены CAR, описанные в данном описании: (1) антигены, ассоциированные с раком, которые экспрессируются на поверхности раковых клеток; и (2) антигены, ассоциированные с раком, которые сами по себе являются внутриклеточными, однако фрагмент такого антигена (пептида) презентирован на поверхности раковых клеток МНС (главным комплексом гистосовместимости). Данное изобретение также относится к иммунным эффекторным клеткам (*например*, Т клеткам, НК-клеткам), которые содержат эндогенные TCR и/или сконструированы для экспрессии одной или нескольких стимулирующих молекул NF-κB, которые направляют иммунные эффекторные клетки к патологическим клеткам или связанным с болезнью клеткам, таким как раковые клетки.

[00273] Кроме того, данное изобретение относится к CAR, TCR и CAR/TCR-экспрессирующим клеткам, которые также экспрессируют NF-κB стимулирующую молекулу, и их применению в лекарственных средствах или способах лечения, среди других заболеваний, рака или любых злокачественных или аутоиммунных заболеваний, инфекционных заболеваний или дегенеративных заболеваний, или аллергических заболеваний, в которых принимают участие клетки или ткани, которые экспрессируют опухолевый антиген или ассоциированный с заболеванием антиген, как описано в данном документе.

[00274] В одном варианте осуществления данное изобретение относится к иммунной эффекторной клетке (*например*, Т-клетке, НК-клетке), сконструированной для экспрессии не встречающегося в природе иммунного рецептора, *например*, CAR и/или TCR, и NF-κB стимулирующей молекулы, при этом сконструированная иммунная эффекторная клетка обладает активностью против заболевания, такой как противоопухолевая активность. Один тип антигена представляет собой ассоциированный с раком антиген (*т. е.* опухолевый антиген), описанный в данном документе. В одном аспекте антигенсвязывающий домен не встречающегося в природе иммунного рецептора, *например*, CAR, содержит частично гуманизированный фрагмент антитела. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий домен не встречающегося в природе иммунного рецептора, *например*, CAR, содержит частично гуманизированный scFv. Соответственно, данное изобретение относится к не встречающимся в природе иммунным рецепторам, *например*, CAR, которые содержат гуманизированный антигенсвязывающий домен и встроены в клетку, *например*, в Т-клетку или НК-клетку, при этом указанная клетка также экспрессирует NF-κB стимулирующие молекулы, и способам их использования для адаптивной терапии.

[00275] В одном варианте осуществления данное изобретение раскрывает иммунную эффекторную клетку (*например*, Т-клетку, НК-клетку) с ее эндогенным иммунным рецептором (*например*, TCR), который сконструирован для экспрессии NF-κB стимулирующей молекулы, при этом сконструированная иммунная эффекторная клетка демонстрирует активность против заболевания, такую как противоопухолевую активность или активность против HIV-1.

[00276] Кроме того, в данном документе представлены генно-инженерные клетки, содержащие полинуклеотиды и/или не встречающиеся в природе иммунные рецепторы, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления указанная клетка представляет собой Т-лимфоцит (Т клетку). В некоторых вариантах осуществления указанная клетка представляет собой наивные Т клетки, Т клетки центральной памяти, эффекторные Т клетки памяти, регуляторные Т клетки (Treg) или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления указанная клетка представляет собой клетку природного киллера (NK), гемопоэтическую стволовую клетку (HSC), эмбриональную стволовую клетку или плюрипотентную стволовую клетку. Генно-инженерные клетки, которые могут содержать и экспрессировать не встречающиеся в природе иммунные рецепторы (*например*, CAR и/или TCR) по данному изобретению в комбинации со NF-κB стимулирующей молекулой, включают, но не ограничиваются ими, Т-лимфоциты (Т - клетки), наивные Т-клетки (TN), Т-клетки памяти (*например*, Т-клетки центральной памяти (TCM), эффекторные клетки памяти (TEM)), природные клетки-киллеры, гемопоэтические стволовые клетки и/или плюрипотентные эмбриональные/индуцированные стволовые клетки способные дать начало терапевтически значимому потомству. В одном варианте осуществления генно-инженерные клетки представляют собой аутологичные клетки. В одном варианте осуществления генно-инженерные клетки представляют собой аллогенные клетки. В качестве примера, индивидуальные Т клетки по данному изобретению могут быть CD4+/CD8-, CD4-/CD8+, CD4-/CD8- или CD4+/CD8+. Т клетки могут представлять собой смешанную популяцию клеток CD4+/CD8- и CD4-/CD8+ или популяцию одного клона. CD4+ Т клетки по данному изобретению могут продуцировать IL-2, IFNγ, TNFα и другие Т-клеточные эффекторные цитокины при совместном культивировании *in vitro* с клетками, экспрессирующими целевые антигены (*например*, CD20+ и/или CD19+ клетки опухоли). CD8+ Т клетки по данному изобретению могут лизировать антиген-специфические клетки-мишени при совместном культивировании *in vitro* с клетками-мишенями. В некоторых вариантах осуществления Т клетки могут представлять собой любую одну или большее количество из CD45RA+ CD62L+ наивных клеток, CD45RO+ CD62L+ клеток центральной памяти, CD62L-эффекторных клеток памяти или их комбинации (Berger et al, Adoptive transfer of virus-specific and tumor-specific T cell immunity. Curr Opin Immunol 2009 21(2)224-232). Генетически модифицированные клетки могут быть получены путем стабильной трансфекции клеток ДНК, кодирующей не встречающиеся в природе иммунные рецепторы (*например*, CAR и/или TCR) и/или NF-κB стимулирующую молекулу по данному изобретению. Трансфицированные клетки, демонстрирующие присутствие единого интегрированного не перестроенного вектора и экспрессию не встречающихся в природе иммунных рецепторов (*например*, CAR и/или TCR) и/или NF-κB стимулирующей молекулы, могут быть размножены *ex vivo*. В одном варианте осуществления клетки, отобранные для экспансии *ex vivo*, представляют собой CD8+ и демонстрируют способность специфически распознавать и лизировать антиген-

специфические клетки-мишени.

[00277] Стимуляция Т-клеток антигеном в надлежащих условиях приводит к пролиферации (размножению) клеток и/или продукции ИЛ-2. Клетки, содержащие не встречающиеся в природе иммунные рецепторы (*например*, CAR и/или TCR) и/или NF-κB стимулирующую молекулу по данному изобретению, будут увеличиваться в количестве в ответ на связывание одного или большего количества антигенов с антиген-специфическим целевой областью неприродных иммунных рецепторов (*например*, CAR и/или TCR). Данное раскрытие также обеспечивает способ получения и размножения клеток, экспрессирующих не встречающийся в природе иммунный рецептор (*например*, CAR и/или TCR). Способ включает трансфекцию или трансдукцию клеток вектором (ами), экспрессирующими не встречающийся в природе иммунный рецептор (*например*, CAR и/или TCR) и/или NF-κB стимулирующую молекулу, и стимуляцию клеток клетками, экспрессирующими антигены-мишени, рекомбинантные антигены-мишени или антитело к рецептору, вызывающее пролиферацию клеток с целью создания и размножения Т-клеток. В одном варианте осуществления клетки могут представлять собой любые одни или большее количество из Т-лимфоцитов (Т-клеток), естественных киллеров (NK), гемопоэтических стволовых клеток (HSC) или плюрипотентных эмбриональных/индуцированных стволовых клеток, способных давать начало терапевтически значимому потомству. В одном варианте осуществления NF-κB стимулирующая молекула может экспрессироваться в клетках (*например*, Т клетках, NK-клетках или стволовых клетках, которые могут давать иммунные клетки) без введения не встречающихся в природе иммунных рецепторов (*например*, CAR и/или TCR).

[00278] Иммунные эффекторские клетки, такие как Т клетки и NK-клетки, содержащие не встречающиеся в природе иммунные рецепторы (*например*, CAR и/или TCR) и/или NF-κB стимулирующую молекулу, как описано в данном документе, могут быть активированы и размножены, как правило, с использованием способов, как описано, например, в патентах США 6352694; 6534055; 6905680; 6692964; 5858358; 6887466; 6905681; 7144575; 7067318; 7172869; 7232566; 7175843; 5883223; 6905874; 6797514; 6867041; и публикация заявки на патент США № 20060121005.

[00279] В одном варианте осуществления генно-инженерные клетки содержат молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие обычные CAR 1-6 или обычные CAR 1-6, которые являются частью остовов, описанных в данном документе, такие как остов-1, остов-2, остов-13, остов-14, остов-37, остов-38, остов-49, остов-50, остов-60 или остов-61, и NF-κB стимулирующую молекулу, при этом антигенспецифический домен указанных CAR специфичен к MPL, CD19, CD20, BCMA, CD22, CD30, CD33, CD123, CD138, CLL1, константной цепи TCR-бета 1, константной цепи TCR-бета2, TCR гамма/дельта, мезотелину, IL13Ra2, ALK, PTK7, DLL3, TROP2, Tim1, LAMP1, CS1, Lym1, Lym2, TSHR, комплексу NY-ESO-1/МНС класса I, комплексу WT1/МНС класса I, комплексу Ras/МНС класса I, комплексу AFP/МНС класса I, комплексу HPV-E6/МНС класса I, комплексу HPV-E7/МНС класс I, CD179a, CLD18A2, эпитопу CD43 или белку env gp120 HIV1.

[00280] В одном варианте осуществления указанная клетка представляет собой Т клетку, и у указанной Т клетки отсутствуют одна или нескольких цепей эндогенных рецепторов Т-клеток. Т клетки, стабильно лишенные экспрессии функционального TCR согласно данному изобретению, могут быть получены с использованием разнообразных подходов, таких как использование нуклеаз Zn пальцев (ZFN), CRISP/Cas9 и кшРНК, нацеленных на эндогенные цепи рецепторов Т-клеток. Неограничивающий иллюстративный способ, относящийся к кшРНК, описан в US 2012/0321667A1, который включен в данное описание посредством ссылки. Другой неограничивающий иллюстративный метод, относящийся к устранению эндогенной экспрессии TCR с использованием ZFN, нацеленных на константные области α - и β -цепей TCR, описан в Torikai H et al. (Blood, 119 (24), 14 June 2012).

[00281] Т клетка, лишенная функционального эндогенного TCR, может быть, *например*, сконструирована таким образом, чтобы она не экспрессировала какой-либо функциональный эндогенный TCR на своей поверхности, сконструирована таким образом, чтобы она не экспрессировала одну или большее количество субъединиц (*например*, константные цепи эндогенного TCR α , TCR β 1, TCR β 2, TCR γ , TCR δ или pre-TCR α), которые содержат функциональный эндогенный TCR или сконструирована таким образом, что она продуцирует очень мало функциональных эндогенных TCR на своей поверхности. Альтернативно, Т клетка может экспрессировать существенно нарушенный эндогенный TCR, *например*, путем экспрессии мутированных или усеченных форм одной или нескольких субъединиц TCR. Термин «существенно нарушенный TCR» означает, что этот TCR не будет вызывать неблагоприятную иммунную реакцию у хозяина. В еще одной альтернативе не встречающийся в природе иммунный рецептор (*например*, CAR и/или TCR) и/или NF- κ B стимулирующая молекула может быть клонирован в локусы TCR в геноме Т-клеток и, таким образом, не встречающиеся в природе иммунные рецепторы (*например*, CAR и/или TCR) и/или NF- κ B стимулирующая молекула будут находиться под контролем системы экспрессии эндогенных Т-клеток.

[00282] Данное раскрытие демонстрирует, что в отличие от ситуации с конструкциями CAR 1-го или 2-го поколения TFP, основанные на цепях CD3 ϵ , CD3 γ и CD3 δ (обозначенные как TFP CD3 $\epsilon/\gamma/\delta$), имеют низкую экспрессию и активность при экспрессии в $\alpha\beta$ Т клетках, которые не имеют или имеют нарушенную функцию эндогенного или родной TCR α полипептидной цепи на их поверхности. Например, наблюдается, что CD3 $\epsilon/\gamma/\delta$ TFP обладают нарушенной экспрессией и активностью (*например*, активацией Т-клеток, пролиферацией, продукцией цитокинов и цитотоксичностью *и т. д.*). В $\alpha\beta$ -клетке, в которой эндогенный геномный TRAC-локус был нарушен экспрессионной кассетой TFP. Данное изобретение обеспечивает решение этой проблемы путем реэкспрессии полипептида с константной цепью TCR α (цепи TRAC) или его фрагмента в Т клетках, в которых экспрессия нативного полноразмерного полипептида цепи TCR α была снижена или устранена. В одном варианте осуществления повторно экспрессируемый полипептид константной цепи TCR α или фрагмент

константной цепи TCR α позволяет восстановить функциональный сигнальный комплекс CD3 ϵ / γ / δ TFP-TCR-CD3 в $\alpha\beta$ Т-клетке, в которой экспрессия нативной константной цепи TCR α ухудшается, уменьшается или устраняется. В одном варианте осуществления реэкспрессируемый фрагмент константной цепи TCR α или фрагмент константной цепи TCR α усиливает более чем на 15% (*например*, более чем на 20%, 50%, 75% или 100% *и т. д.*) индуцированную целевым антигеном продукцию цитокинов (*например*, IL2, TNF α , IFN γ), пролиферацию и/или цитотоксическую активность CD3 ϵ / γ / δ -TFP-экспрессирующей $\alpha\beta$ Т-клетки, в которой экспрессия нативной константной цепи TCR α нарушена, снижена или устранена. В одном варианте осуществления реэкспрессированная константная цепь TCR α или фрагмент константной цепи TCR α обеспечивает повышенную экспрессию TFP CD3 ϵ / γ / δ в $\alpha\beta$ Т-клетке, в которой экспрессия нативной константной цепи TCR α нарушена, снижена или устранена. В одном варианте осуществления экспрессированная константная цепь TCR α или фрагмент константной цепи TCR α позволяет более чем на 15% (*например*, более 20%, 50%, 75% или 100% *и т. д.*) увеличить экспрессию CD3 ϵ / γ /TFP в $\alpha\beta$ Т-клетке, в которой экспрессия нативной константной цепи TCR α нарушена, снижена или устранена. В иллюстративном варианте осуществления экспрессия и сигнальная активность CD3 ϵ / γ / δ TFP могут быть восстановлены в $\alpha\beta$ Т-клетках, в которых экспрессия нативной цепи TCR α снижена или устранена путем введения в такие Т-клетки конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей экзогенную константную цепь TCR α (цепь TRAC) (*например*, SEQ ID NO: 1010). В предпочтительном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая экзогенную цепь TRAC, кодон-оптимизирована и отличается от эндогенной или нативной константной цепи TCR α своей нуклеотидной последовательностью. В альтернативном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая экзогенную цепь TRAC, кодон-оптимизирована и несет одну или большее количество аминокислотных замен, которые, как известно, усиливают экспрессию константной цепи TCR α человека (**см. Таблицу 3**). В одном из примеров варианта осуществления экзогенные цепи TRAC, которые можно использовать для обеспечения реэкспрессии и/или активности комплекса TFP-TCR-CD3 в $\alpha\beta$ Т-клетках, в которых экспрессия эндогенного гена TCR α была подавлена или устранена, имеют последовательность как продемонстрировано в SEQ ID NO: 3886-3894 или имеют последовательности, которые кодируют полипептиды с гомологией более 80% к полипептидам, кодируемым последовательностями, продемонстрированными в SEQ ID NO: 3886-3894. Для обеспечения экспрессии на клеточной поверхности нуклеотидная последовательность, кодирующая экзогенную константную цепь TCR α (TRAC), функционально связана с нуклеотидной последовательностью, кодирующей сигнальный пептид. В одном варианте осуществления дополнительные не встречающиеся в природе последовательности (*например*, линкеры или антигенсвязывающий домен) могут быть необязательно добавлены к последовательности, кодирующей цепь TRAC, если они не влияют на ее способность рекрутировать другие компоненты передачи сигналов TCR-CD3 сложный и/или CD3 ϵ / γ / δ TFP. В одном из вариантов осуществления экзогенный

полипептид константной цепи TCR α не является функционально связанным с нативной последовательностью V α (*т.е.* антигенсвязывающим доменом), присутствующей в Т клетке, в которой он экспрессируется. В одном варианте осуществления экспрессия экзогенного полипептида константной цепи TCR α не позволяет $\alpha\beta$ -клетке восстанавливать свою специфичность и/или аффинность распознавания нативного антигена, *например*, распознавать комплекс МНС-пептидный антиген, который был распознан Т-клеткой с ее эндогенной цепью TCR α . В иллюстративном варианте осуществления вспомогательный модуль, кодирующий экзогенную константную цепь TCR α , может экспрессироваться в β Т-клетках либо сам по себе (SEQ ID NO: 1010), используя соответствующий метод (*например*, опосредованный лентивирусами перенос гена), либо он может быть коэкспрессирован с кассетами экспрессии TFP с использованием одного вектора (*например*, лентивирусного вектора). Альтернативные способы доставки и экспрессии двух или более генов или РНК известны в данной области и описаны в данном раскрытии и могут быть применены в альтернативных вариантах осуществления данного изобретения. Нуклеотидная последовательность иллюстративных конструкций, коэкспрессирующих константную цепь TCR α с CD3 $\epsilon/\gamma/\delta$ TFP-конструкциями, нацеленными на MPL, продемонстрирована в SEQ ID NO: 3538, 3540 и 3542. В иллюстративной конструкции CD8SP -MPL-Hu-161-2- (vL-vH) -CD3 ϵ -ECDTMCP-opt2-F-P2A-IgSP- (SEQ ID NO: 3538) первая кассета кодирует CD3 ϵ -TFP, содержащий сигнальный пептид CD8, за которым следует гуманизированный scFV, нацеленный на белок MPL человека, и внеклеточный, трансмембранный и цитозольный домен CD3 ϵ . За этой, кодирующей TFP кассетой, следует рамка, кодирующая Furine-SGSG-P2A и кассету, кодирующую сигнальный пептид (IgSP) и кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность, кодирующую TRAC. В иллюстративном варианте осуществления вся кассета может быть экспрессирована в β -клетках, лишенных эндогенной цепи TCR α , с использованием лентивирусного вектора.

[00283] В альтернативном варианте осуществления, экспрессия полипептида константной цепи TCR α может быть восстановлена в $\alpha\beta$ Т клетках, которые не имеют или имеют функционально нарушенные эндогенные или нативные полипептидные цепи TCR α на их поверхности с применением эндогенного гена константной цепи TCR α . В иллюстративном варианте осуществления, экспрессия полипептида константной цепи TCR α может быть восстановлено в $\alpha\beta$ Т клетках, которые не имеют или имеют функционально нарушенные эндогенный или нативный полипептид цепи TCR α на их поверхности с помощью функционального связывания в рамке считывания с последовательностью нуклеиновой кислоты кодирующей сигнальный пептид к по меньшей мере одну копию эндогенного гена константной цепи TCR α с использованием методик редактирования генов, известных в данной области. В иллюстративном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая сигнальный пептид, функционально связана в рамке считывания с первым экзоном по меньшей мере одного из эндогенных генов константной цепи TCR α , чтобы обеспечить экспрессию

полипептида константной цепи TCR α на поверхности Т клетки. В одном варианте осуществления экспрессионная кассета, кодирующая сигнальный пептид и ген константной цепи TCR α , находится под регуляторным транскрипционным контролем эндогенного промотора TCR α . В другом варианте осуществления кассета экспрессии, кодирующая сигнальный пептид и ген константной цепи TCR α , имеет 3'-нетранслируемую последовательность и контрольную регуляторную последовательность эндогенного гена TCR α . В альтернативном варианте осуществления кассета экспрессии, кодирующая сигнальный пептид и ген константной цепи TCR α , находится под экзогенным промотором (*например*, промотором EF1 α или CMV).

[00284] В иллюстративном варианте осуществления экспрессия полипептида с константной цепью TCR α может быть восстановлена в $\alpha\beta$ Т клетках, в которых эндогенный или нативный ген цепи TCR α был нарушен путем нацеленной интеграции кассеты, кодирующей TFP, путем создания нацеливающей кассеты таким образом, чтобы TFP-кассета была затем в рамке считывания с разрезаемым линкером 2A, сигнальным пептидом (*например*, сигнальным пептидом CD8 или сигнальным пептидом IgH) и первый экзон константной цепи TCR α (TRAC) (**Фиг.5C**). Иллюстративная такая нацеливающая конструкция представлена SEQ ID NO: 3860. В этом варианте осуществления константная цепь TCR α экспрессируется геном эндогенной константной цепи TCR α (TRAC), экспрессия которого на клеточной поверхности облегчается сигнальным пептидом, присутствующим в нацеливающей кассете. В этом варианте осуществления константная цепь TCR α экспрессируется под регуляторным контролем промотора гена TCR α и 3'-нетранслируемой области TCR α . Альтернативная иллюстративная нацеливающая конструкция представлена SEQ ID NO: 3859 и может использоваться в альтернативных вариантах осуществления данного изобретения для разрушения эндогенной цепи TCR α путем нацеливания на интеграцию кассеты, кодирующей TFP, при одновременном обеспечении возможности реэкспрессии константной цепи TCR α из кассеты экспрессии, кодирующей сигнальный пептид, за которой следует кодон-оптимизированная кДНК константной цепи TCR α и последовательность polyA (**Фиг. 5B**).

[00285] Данное раскрытие также демонстрирует, что в отличие от ситуации с конструкциями CAR 1-го или 2-го поколения TFP CD3 $\epsilon/\gamma/\delta$ теряют свою активность при экспрессии в $\alpha\beta$ Т-клетках (*т.е.* Т-клетках, экспрессирующих цепи TCR α и TCR β), в которых отсутствуют или имеются функционально нарушенные эндогенные или нативные TCR β 1 и TCR β 2 цепи полипептидов на их поверхности. Например, в описании раскрыто, что CD3 $\epsilon/\gamma/\delta$ TFP обладают нарушенной экспрессией и активностью (*например*, активацией Т-клеток, пролиферацией, продуцированием цитокинов и цитотоксичностью *и т. д.*) в $\alpha\beta$ -клетках, в которых нарушены эндогенные локусы генов TCR β 1 и TCR β 2. Данное изобретение обеспечивает решение этой проблемы путем реэкспрессии полипептидов с константной цепью TCR β 1 или TCR β 2 или их фрагмента в Т клетках, в которых экспрессия нативных полноразмерных полипептидов с цепями TCR β 1 и TCR β 2 была снижена или устранена. В одном варианте осуществления повторно

экспрессированный полипептид константной цепи TCR β 1/ β 2 или фрагмент константной цепи TCR β 1/ β 2 позволяет восстановить функциональный сигнальный комплекс TFP-TCR-CD3 в Т клетке, *например*, в $\alpha\beta$ -клетке, в которой экспрессия константной цепи нативных TCR β 1 и/или β 2 нарушена, уменьшена или устранена. В одном из вариантов осуществления реэкспрессированная константная цепь TCR β 1/ β 2 или фрагмент константной цепи TCR β 1/ β 2 улучшается более чем на 15% (*например*, более чем на 20%, 50%, 75% или 100% *и т. д.*), индуцируемую антигеном-мишенью продукцию цитокинов (*например*, IL2, TNF α , IFN γ), пролиферацию и/или цитотоксическую активность экспрессирующей TFP Т β -клетки, в которой экспрессия нативной TCR β 1 и/или β 2-константной цепи TCR β 1 и/или β 2 нарушена, снижена или устранена. В одном варианте осуществления реэкспрессированная константная цепь TCR β 1/ β 2 или фрагмент константной цепи TCR β 1/ β 2 позволяет усиливать экспрессию TFP CD3 ϵ / γ / δ в $\alpha\beta$ Т-клетке, в которой экспрессия нативных константных цепей TCR β 1 и/или TCR β 2 ухудшается, уменьшается или устраняется. В одном варианте осуществления реэкспрессированная константная цепь TCR β 1/ β 2 или фрагмент константной цепи TCR β 1/ β 2 позволяет более чем на 15% (*например*, более 20%, 50%, 75% или 100% *и т. д.*) увеличить экспрессию CD3 ϵ / γ / δ TFP в $\alpha\beta$ Т-клетке, в которой экспрессия нативной константной цепи TCR β 1 и/или TCR β 2 нарушена, снижена или устранена. В иллюстративном варианте осуществления экспрессия и сигнальная активность CD3 ϵ / γ / δ TFP могут быть восстановлены в Т клетках, в которых экспрессия нативной цепи TCR β 1 и/или TCR β 2 снижена или устранена путем введения в такие Т клетки конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей экзогенную константную цепь TCR β 1/ β 2 (цепь TRBC) (*например*, SEQ ID NO: 1011). В предпочтительном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая экзогенную константную цепь TCR β 1/ β 2, кодон-оптимизирована и отличается от эндогенных или нативных константных цепей TCR β 1 и TCR β 2 в своей нуклеотидной последовательности. В альтернативном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая экзогенную константную цепь TCR β 1/ β 2, кодон-оптимизирована и несет одну или большее количество аминокислотных замен, которые, как известно, усиливают экспрессию константной цепи TCR β 1/ β 2 человека (см. **Таблицу 4а, 4б**). В иллюстративном варианте осуществления экзогенные цепи TCR β 1/ β 2, которые можно использовать для обеспечения реэкспрессии и/или активности комплекса TFP-TCR-CD3 в Т клетках, в которых экспрессия эндогенных цепей TCR β 1 и β 2 была подавлена или исключена имеют последовательность, как продемонстрировано в SEQ ID NO: 3895-3900, или имеют последовательности, которые кодируют полипептиды с более чем 80% -ной гомологией с полипептидами, кодируемыми последовательностями, продемонстрированными в SEQ ID NO: 3895-3900. Для обеспечения экспрессии на клеточной поверхности нуклеотидная последовательность, кодирующая экзогенную константную цепь TCR β 1/ β 2 (TRBC), функционально связана с нуклеотидной последовательностью, кодирующей сигнальный пептид. В одном варианте осуществления дополнительные не встречающиеся в природе последовательности

(например, линкеры или антигенсвязывающий домен) могут быть необязательно добавлены к последовательности, кодирующей константную цепь TCR β 1/ β 2 (TRBC), при условии, что они не влияют на ее способность рекрутировать другие компоненты сигнального комплекса TCR-CD3 и/или TFP. В одном из вариантов осуществления экзогенный полипептид константной цепи TCR β 1/ β 2 не является функционально связанным с нативной последовательностью V β (*т.е.* антигенсвязывающим доменом), присутствующей в Т клетке, в которой он экспрессируется. В одном варианте осуществления экспрессия экзогенного полипептида константной цепи TCR β 1/ β 2 не позволяет Т клетке восстановить свою специфичность и/или аффинность распознавания нативного антигена, например, распознавать комплекс МНС-пептидный антиген, который был распознан Т клеткой с ее эндогенной цепью TCR β 1/ β 2. В иллюстративном варианте осуществления вспомогательный модуль, кодирующий экзогенную константную цепь TCR β 1/ β 2, может быть экспрессирован в Т-клетках либо сам по себе (например, SEQ ID NO: 1011), используя соответствующий метод (например, опосредованный лентивирусами перенос гена), либо он может быть экспрессируется совместно с кассетами экспрессии TFP CD3 ϵ / γ / δ с использованием одного вектора (например, лентивирусного вектора). Альтернативные способы доставки и экспрессии двух или более генов или РНК известны в данной области и описаны в данном раскрытии и могут использоваться в альтернативных вариантах осуществления раскрытия. Нуклеотидная последовательность иллюстративных конструкций, коэкспрессирующих константную цепь TCR β с конструкциями TFP, нацеленными на MPL, продемонстрирована в SEQ ID NO: 3537, 3539 и 3541. В иллюстративной конструкции CD8SP-MPL-Hu-161-2-(vL-vH)-CD3 ϵ -ECDTMCP-opt2-F-P2A-IgSP-[TRBC-opt2] (SEQ ID NO: 3537) первая кассета кодирует TFP, содержащий сигнальный пептид CD8, за которым следует гуманизированный scFV, нацеленный на белок MPL человека, и внеклеточный, трансмембранный и цитозольный домен CD3 ϵ . За этой кодирующей TFP кассетой следует кадр, кодирующий Furine-SGSG-P2A и кассету, кодирующую сигнальный пептид (IgSP) и кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность, кодирующую константную цепь TCR β (TRBC). В иллюстративном варианте осуществления вся кассета может быть экспрессирована в Т клетках, лишенных эндогенной цепи TCR β , с использованием лентивирусного вектора.

[00286] В альтернативном варианте осуществления, экспрессия TCR β 1 или β 2 полипептида константной цепи может быть восстановлена в $\alpha\beta$ Т клетках, которые не имеют или имеют функционально нарушенный эндогенный или нативный полипептид цепи TCR α на их поверхности с использованием гена эндогенной константной цепи TCR β 1 или β 2. В иллюстративном варианте осуществления, экспрессия TCR β 1/ β 2 константной цепи полипептида и коэкспрессироваться TFP может быть восстановлен в $\alpha\beta$ Т клетках, которые не имеют или имеют функционально нарушенный эндогенный или нативный полипептид цепи TCR α на их поверхности с помощью функционального связывания в рамке считывания последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей сигнальный пептид по меньшей мере, для одной копии эндогенного гена константной цепи TCR β 1 или

TCR β 2 с использованием методов редактирования генов, известных в данной области. В иллюстративном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая сигнальный пептид, функционально связана в рамке считывания с первым экзоном по меньшей мере одного из эндогенных генов константной цепи TCR β 1 или TCR β 2, чтобы обеспечить экспрессию полипептида константной цепи TCR β 1/ β 2 и коэкспрессированный TFP на поверхности Т-клеток. В одном варианте осуществления кассета экспрессии, кодирующая сигнальный пептид и константную цепь TCR β 1/ β 2, находится под регуляторным транскрипционным контролем эндогенного промотора TCR β 1/ β 2. В одном варианте осуществления кассета экспрессии, кодирующая сигнальный пептид и константную цепь TCR β 1/ β 2, находится под 3'-нетранслируемой последовательностью и регуляторным контролем эндогенного гена TCR β 1/ β 2. В альтернативном варианте осуществления кассета экспрессии, кодирующая сигнальный пептид и константную цепь TCR β 1/ β 2, находится под экзогенным промотором (*например*, промотором EF1 α или CMV).

[00287] В одном из примеров варианта осуществления экспрессия полипептида с константной цепью TCR β 1/ β 2 может быть восстановлена в $\alpha\beta$ Т клетках, в которых эндогенные или нативные гены цепи TCR β 1 и TCR β 2 были нарушены путем целевой интеграции кассет, кодирующих TFP, путем создания целевой кассеты таким образом, что за кассетой TFP следуют в рамке считывания разрезаемый линкер 2A, сигнальный пептид (*например*, сигнальный пептид CD8 или сигнальный пептид IgH) и первый экзон константной цепи TCR β 1/ β 2 (TRBC).

[00288] Наблюдалось, что направление CAR-кассеты в локус TRAC приводит к тому, что приблизительно 95% Т-клеток становятся TCR-негативными. Такие TCR-негативные Т клетки могут быть применены в аллогенной обстановке, поскольку они с меньшей вероятностью вызывают заболевание трансплантат против хозяина (GVHD). Однако реэкспрессия цепи TRAC в Т клетках, в которых локус TRAC был нацелен кассетой TFP, потенциально может привести к экспрессии полноразмерной цепи TCR β , включая область V β . Такие Т клетки, даже несмотря на отсутствие распознавания МНС, обеспечиваемого областью V α , потенциально могут распознавать алло-антигены, представленные комплексом МНС, через их цепи TCR β и, следовательно, потенциально вызывают GVHD. В альтернативных вариантах осуществления данного изобретения обе цепи TCR α и TCR β 1 или β 2 реэкспрессируются в CD3 ϵ / γ / δ TFP-экспрессирующих $\alpha\beta$ Т клетках, в которых экспрессия эндогенных цепей TCR α и TCR β 1 и TCR β 2 подавлена или устранена.

[00289] В приведенном выше примере экзогенный TRAC или TRBC коэкспрессируется с TFP-экспрессирующей конструкцией для восстановления экспрессии и/или активности CD3 ϵ / γ / δ TFP в $\alpha\beta$ Т-клетках, в которых происходит экспрессия эндогенного TCR α и/или TCR β цепи были подавлены или устранены, например, путем разрушения их геномных локусов. В альтернативном варианте осуществления данного изобретения экспрессия экзогенных константных цепей TCR α и/или TCR β 1/ β 2

используется для восстановления экспрессии комплекса TCR/CD3 в любой α/β Т-клетке, включая α/β Т-клетку дикого типа или α - β Т-клетку/ β Т клетку, экспрессирующие химерный антигенный рецептор, химерный Т-клеточный рецептор (сTCR), AbTCR или синтетический иммунный рецептор. Наконец, аналогичный подход можно использовать для восстановления экспрессии CAR/TFP и/или TCR/CD3 в γ/δ Т-клетках, в которых экспрессия эндогенных цепей TCR γ и/или TCR δ подавлена или устранена. Иллюстративные константные цепи TCR γ (TRGC) и TCR δ (TRDC), которые можно экспрессировать в γ/δ Т-клетках, в которых экспрессия эндогенных цепей TCR γ и/или TCR δ подавлена или устранена, представлены SEQ ID NO: 3912 и 3913.

[00290] Данное раскрытие также предусматривает, что экспрессия и активность CD3 $\epsilon/\gamma/\delta$ TFP могут быть восстановлены в Т клетках с нарушением или отсутствием экспрессии нативных цепей TCR $\alpha/\beta/\gamma$ или δ путем реэкспрессии фрагментов или вариантов константных цепей TCR $\alpha/\beta/\gamma$ или δ . Фрагменты/варианты константных цепей TCR $\alpha/\beta/\gamma$ и δ , которые можно использовать для восстановления экспрессии CD3 $\epsilon/\gamma/\delta$ TFP в клетках, лишенных нативных цепей TCR $\alpha/\beta/\gamma$ или δ , представлены в SEQ ID NO: 15141-15144 (**Таблица 6D**). Кассеты экспрессии, кодирующие эти цепи сигнальным пептидом IgH, перечислены в SEQ ID NO: 15145-15148 (**Таблица 7**).

[00291] Данное раскрытие далее предусматривает, что экспрессия и активность CD3 $\epsilon/\gamma/\delta$ TFP могут быть восстановлены в Т клетках с нарушением или отсутствием экспрессии нативных цепей TCR $\alpha/\beta/\gamma$ или δ путем коэкспрессии SIR или Ab-TCR, содержащего отсутствующие константные цепи TCR $\alpha/\beta/\gamma$ или δ . Таким образом, в $\alpha\beta$ Т клетках с нарушением или отсутствием экспрессии нативной цепи TCR α экспрессия и активность TFP CD3 $\epsilon/\gamma/\delta$ могут быть сохранены экспрессией SIR, содержащей константную цепь TCR α . В иллюстративном варианте осуществления в $\alpha\beta$ Т клетках с нарушением или отсутствием экспрессии нативной цепи TCR α экспрессия и активность CD3 $\epsilon/\gamma/\delta$ TFP (например, TFP, кодируемого SEQ ID NO: 8708-8714) могут быть сохранены путем экспрессии SIR (*например*, SIR, представленного SEQ ID NO: 9668, 9669 или 9684 *и т. д.*), содержащего константную цепь TCR α . В другом иллюстративном варианте осуществления в $\alpha\beta$ Т клетках с нарушением или отсутствием экспрессии нативной цепи TCR α экспрессия и активность TFP CD3 $\epsilon/\gamma/\delta$ (например, TFP, кодируемого SEQ ID NO: 8708-8714) могут быть сохранены путем экспрессии Ab-TCR (*например*, Ab-TCR, представленного SEQ ID NO: 9677 или 9678 *и т. д.*), содержащего часть константной цепи TCR α . Данное раскрытие изобретения предусматривает, что для комбинированной терапии с аллогенными Т клетками, содержащими два CAR, CD3 $\alpha/\gamma/\delta$ TFP предпочтительно комбинируют с SIR и/или Ab-TCR, который содержит константную цепь TCR или фрагмент константной цепи TCR, экспрессия которого снижена или отсутствует в аллогенных Т клетках.

[00292] Данное раскрытие далее предусматривает, что в $\alpha\beta$ Т клетках с нарушенной или недостаточной экспрессией нативных цепей TCR β экспрессия и активность CD3 $\epsilon/\gamma/\delta$ TFP могут быть сохранены экспрессией SIR, содержащей константную цепь TCR β . В

одном из примеров варианта осуществления в $\alpha\beta$ Т клетках с нарушенной или недостаточной экспрессией нативных цепей TCR β 1/ β 2 экспрессия и активность TFP CD3 ϵ / γ / δ (например, TFP, кодируемого SEQ ID NO: 8708-8714) может быть сохранена путем экспрессии SIR (*например*, SIR, представленного SEQ ID NO: 9668, 9669 или 9684 *и т. д.*), содержащего константную цепь TCR β . В другом иллюстративном варианте осуществления в $\alpha\beta$ Т клетках с нарушением или отсутствием экспрессии нативной цепи TCR α экспрессия и активность TFP CD3 ϵ / γ / δ (например, TFP, кодируемого SEQ ID NO: 8708-8714) могут быть сохранены путем экспрессии Ab-TCR (*например*, Ab-TCR, представленного SEQ ID NO: 9677 или 9678 *и т. д.*), содержащего часть константной цепи TCR β .

[00293] Данное раскрытие далее предусматривает, что в $\gamma\delta$ Т-клетках с нарушенной или недостаточной экспрессией нативной цепи TCR γ , экспрессия и активность CD3 ϵ / γ / δ TFP могут быть сохранены экспрессией SIR, содержащей константную цепь TCR γ . В иллюстративном варианте осуществления в $\gamma\delta$ Т-клетках с нарушением или отсутствием экспрессии нативной цепи TCR γ экспрессия и активность TFP CD3 ϵ / γ / δ (например, TFP, кодируемого SEQ ID NO: 8708-8714) могут быть сохранены путем экспрессии SIR (*например*, SIR, представленного SEQ ID NO: 9689), содержащего константную цепь TCR γ . В другом иллюстративном варианте осуществления в $\gamma\delta$ Т-клетках с нарушением или отсутствием экспрессии нативной цепи TCR γ экспрессия и активность TFP CD3 ϵ / γ / δ (например, TFP, кодируемого SEQ ID NO: 8708-8714) могут быть сохранены путем экспрессии Ab-TCR (*например*, Ab-TCR, представленного SEQ ID NO: 9676), содержащего часть константной цепи TCR γ .

[00294] Данное раскрытие далее предусматривает, что в $\gamma\delta$ Т-клетках с нарушением или отсутствием экспрессии нативной цепи TCR δ экспрессия и активность CD3 ϵ / γ / δ TFP могут быть сохранены экспрессией SIR, содержащего константную цепь TCR δ . В иллюстративном варианте осуществления в $\gamma\delta$ Т-клетках с нарушением или отсутствием экспрессии нативной цепи TCR δ экспрессия и активность CD3 ϵ / γ / δ TFP (например, TFP, кодируемого SEQ ID NO: 8708-8714) могут быть сохранены посредством экспрессии SIR (*например*, SIR, представленного SEQ ID NO: 9689), содержащего константную цепь TCR δ . В другом иллюстративном варианте осуществления в $\gamma\delta$ Т-клетках с нарушением или отсутствием экспрессии нативной цепи TCR δ экспрессия и активность TFP CD3 ϵ / γ / δ (например, TFP, кодируемого SEQ ID NO: 8708-8714) могут быть сохранены путем экспрессии Ab-TCR (*например*, Ab-TCR, представленного SEQ ID NO: 9676), содержащего часть константной цепи TCR δ .

[00295] Данное раскрытие также предоставляет способы и конструкции, которые позволяют экспрессировать CAR следующего поколения (*например*, SIR и AbTCR), сTCR и TCR с помощью физиологических регуляторных механизмов, обеспечиваемых эндогенными генами TCR. Данное раскрытие также предоставляет способы и конструкции, которые позволяют экспрессировать CAR следующего поколения (*например*, SIR и AbTCR), сTCR и TCR под промотором и 3'-нетранслируемыми

регуляторными механизмами, обеспечиваемыми эндогенными генами TCR. В одном варианте осуществления данное изобретение раскрывает способы, позволяющие использовать кассету экспрессии, кодирующую SIR/cTCR/Ab-TCR/TCR, в эндогенном локусе гена TCR α , TCR β 1/ β 2, TCR γ или TCR δ . В одном варианте осуществления SIR/cTCR/Ab-TCR/TCR нацелены на эндогенный локус гена TCR α (TRAC), так что константная цепь TCR α SIR/cTCR/Ab-TCR/TCR экспрессируется полностью или частично из эндогенного нативного гена константной цепи TCR α . В одном варианте осуществления SIR/cTCR/Ab-TCR/TCR нацелены на эндогенный локус гена TCR α (TRAC), так что константная цепь TCR α SIR/cTCR/Ab-TCR/TCR кодируется полностью или частично посредством по крайней мере, одного из экзонов эндогенного гена константной цепи TCR α . В одном варианте осуществления SIR/cTCR/Ab-TCR/TCR нацелены на эндогенный локус гена TCR α (TRAC), так что константная цепь TCR α SIR/cTCR/Ab-TCR/TCR полностью или частично разделяет 3' нетранслируемую область и последовательность полиаденилирования гена константной цепи нативного/эндогенного TCR α .

[00296] В одном варианте осуществления SIR/cTCR/Ab-TCR/TCR нацелены на эндогенный локус гена TCR β (TRBC), так что константная цепь TCR β SIR/cTCR/Ab-TCR/TCR экспрессируется полностью или частично из эндогенного нативного гена константной цепи TCR β 1 или TCR β 2. В одном варианте осуществления SIR/cTCR/Ab-TCR/TCR нацелены на эндогенный локус гена TCR β 1/ β 2 (TRBC), так что константная цепь TCR β SIR/cTCR/Ab-TCR/TCR кодируется полностью или частично по крайней мере одним из экзонов эндогенного гена константной цепи TCR β . В одном варианте осуществления SIR/cTCR/Ab-TCR/TCR нацелены на эндогенный локус гена TCR β 1/ β 2 (TRBC), так что константная цепь TCR β SIR/cTCR/Ab-TCR/TCR полностью или частично имеет последовательность 3' нетранслируемой области и последовательность полиаденилирования гена константной цепи нативного/эндогенного TCR β .

[00297] В одном варианте осуществления SIR/cTCR/Ab-TCR/TCR нацелены на эндогенный локус гена TCR γ (TRGC), так что константная цепь TCR γ SIR/cTCR/Ab-TCR/TCR экспрессируется полностью или частично из эндогенного нативного гена константной цепи TCR γ . В одном варианте осуществления SIR/cTCR/Ab-TCR/TCR нацелены на эндогенный локус гена TCR γ (TRGC), так что константная цепь TCR γ SIR/cTCR/Ab-TCR/TCR кодируется полностью или частично посредством, по крайней мере, одного из экзонов эндогенного гена константной цепи TCR γ . В одном варианте осуществления SIR/cTCR/Ab-TCR/TCR нацелены на эндогенный локус гена TCR γ (TRGC), так что константная цепь TCR γ SIR/cTCR/Ab-TCR/TCR полностью или частично имеет последовательность 3' нетранслируемой области и последовательность полиаденилирования гена константной цепи нативного/эндогенного TCR γ .

[00298] В одном варианте осуществления SIR/cTCR/Ab-TCR/TCR нацелены на эндогенный локус гена TCR δ (TRDC), так что константная цепь TCR δ SIR/cTCR/Ab-TCR/TCR экспрессируется полностью или частично из эндогенного нативного гена константной цепи TCR δ . В одном варианте осуществления SIR/cTCR/Ab-TCR/TCR

нацелены на эндогенный локус гена $TCR\delta$ (TRGC), так что константная цепь $TCR\delta$ SIR/cTCR/Ab-TCR/TCR кодируется полностью или частично посредством хотя бы одного из экзонов эндогенного гена константной цепи $TCR\delta$. В одном варианте осуществления SIR/cTCR/Ab-TCR/TCR нацелены на эндогенный локус гена $TCR\delta$ (TRDC), так что константная цепь $TCR\delta$ SIR/cTCR/Ab-TCR/TCR полностью или частично имеет последовательность 3' нетранслируемой области и последовательность полиаденилирования гена константной цепи нативного/эндогенного $TCR\delta$.

[00299] Т клетки или естественные киллеры (NK) или стволовые клетки могут быть получены от субъекта. Предполагается, что термин «субъект» включает живые организмы, у которых может быть вызван иммунный ответ (*например*, млекопитающие). Примеры субъектов включают людей, обезьян, шимпанзе, собак, кошек, мышей, крыс и их трансгенных видов. Т клетки могут быть получены из ряда источников, включая моноклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатического узла, пуповинную кровь, ткань тимуса, ткань из места инфекции, асцит, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли. Т клетки могут быть тканевыми резидентными гамма-дельта Т клетками, которые могут быть выращены и размножены *in vitro* до экспрессии CAR/TCR и/или NF- κ B стимулирующих молекул.

[00300] В определенных вариантах осуществления данного изобретения иммунные эффекторские клетки, *например* Т клетки, могут быть получены из единицы крови, взятой у субъекта, с использованием любого количества методик, известных специалисту в данной области, таких как разделение с помощью Ficoll™. В одном предпочтительном аспекте клетки из циркулирующей крови индивидуума получают аферезом. Продукт для афереза обычно содержит лимфоциты, включая Т клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядерные лейкоциты, эритроциты и тромбоциты. В одном аспекте клетки, собранные с помощью афереза, могут быть промыты для удаления фракции плазмы и, необязательно, для помещения клеток в подходящий буфер или среду для последующих стадий обработки. В одном варианте осуществления клетки промывают фосфатно-солевым буфером (PBS). В альтернативном варианте осуществления в промывающем растворе отсутствует кальций и может отсутствовать магния или могут отсутствовать многие, если не все двухвалентные катионы.

[00301] Начальные этапы активации в отсутствие кальция могут привести к усиленной активации. Специалистам в данной области техники легко понять, что этап промывки может быть осуществлен способами, известными специалистам в данной области, такими как использование полуавтоматической "проточной" центрифуги (*например*, клеточный процессор Cobe 2991, Baxter CytoMate или Haemonetics Cell Saver 5) в соответствии с инструкциями производителя. После промывания клетки могут быть ресуспендированы во множестве биосовместимых буферов, таких как, *например*, не содержащий Ca, не содержащий Mg PBS, PlasmaLyte A или другой физиологический раствор с буфером или без него. Альтернативно, нежелательные компоненты образца афереза могут быть удалены, и клетки непосредственно ресуспендированы в

культуральной среде.

[00302] Это признается, что способы применения могут использовать условия и культуральные среды, содержащие 5% или менее, например, 2%, сыворотки АВ человека, и использовать известные культуральные среды условия и композиции, например, те, которые описаны в 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.

[00303] В одном аспекте, Т клетки выделяют из лимфоцитов периферической крови путем лизиса эритроцитов и истощения моноцитов, например, с помощью противоточной центробежной элютриации или центрифугирования через Percoll™ градиент.

[00304] В одном варианте осуществления данное изобретение раскрывает способы лечения или предотвращения заболевания путем предоставления субъекту, нуждающемуся в этом, иммунных эффекторных клеток (*например*, Т-клеток) или стволовых клеток, которые могут давать иммунные эффекторные клетки, которые сконструированы для экспрессии X- CAR или X-TCR и NF-κB стимулирующая молекула, где X представляет собой ассоциированный с заболеванием антиген, как описано в данном документе, и при этом вызывающие заболевание или ассоциированные с заболеванием клетки экспрессируют указанный X антиген. В **Таблице 9** представлен список различных антигенов и примеров заболеваний, которые можно предотвратить, ингибировать или лечить с использованием иммунных эффекторных клеток, экспрессирующих CAR, нацеленных на эти антигены.

[00305] В другом варианте осуществления данное изобретение раскрывает способы лечения или профилактики рака, инфекции, аутоиммунных или аллергических заболеваний путем предоставления субъекту, нуждающемуся в этом, иммунных эффекторных клеток (*например*, Т-клеток) или стволовых клеток, которые могут дать начало иммунным эффекторным клеткам, которые сконструированы так, чтобы экспрессировать не встречающийся в природе иммунный рецептор (*например*, CAR и/или TCR) по данному раскрытию и/или NF-κB стимулирующую молекулу. В одном варианте осуществления NF-κB стимулирующая молекула представляет собой селективный активатор NF-κB. В одном варианте осуществления активатор NF-κB, *например* селективный активатор NF-κB, является невирусным активатором NF-κB. В одном варианте осуществления активатор NF-κB, *например* селективный активатор NF-κB, не является трансмембранным белком и экспрессируется в цитозоле или преимущественно присутствует в цитозоле. В одном варианте осуществления активатор NF-κB, *например* селективный активатор NF-κB, является конститутивно активным. В одном варианте осуществления активатор NF-κB, *например* селективный активатор NF-κB, не является конститутивно активным. В одном варианте осуществления селективный активатор NF-κB активируется введением индуктора (*например*, димеризатора). В одном варианте осуществления селективный активатор NF-κB представляет собой vFLIP K13, NEMO-

K277A или их производные. CAR/NF-κB стимулирующие молекулы, экспрессирующие иммунные эффекторныe клетки, вводят пациенту. В одном аспекте ассоциированная с заболеванием клетка представляет собой раковую клетку, инфицированную клетку (*например*, HIV-1-инфицированную клетку) или плазматическую клетку, или В-клетку, или Т клетку.

[00306] В другом варианте осуществления данное изобретение раскрывает способы лечения или профилактики рака, инфекции, аутоиммунных или аллергических заболеваний путем предоставления субъекту, нуждающемуся в этом, иммунных эффекторных клеток (*например*, Т-клеток) или стволовых клеток, которые могут дать начало иммунным эффекторным клеткам, которые сконструированы, чтобы экспрессировать естественный иммунный рецептор (*например*, нативный TCR) и NF-κB стимулирующую молекулу. В одном варианте осуществления NF-κB стимулирующая молекула представляет собой селективный активатор NF-κB. В одном варианте осуществления активатор NF-κB, *например* селективный активатор NF-κB, является невирусным активатором NF-κB. В одном варианте осуществления активатор NF-κB, *например* селективный активатор NF-κB, не является трансмембранным белком и экспрессируется в цитозоле или преимущественно присутствует в цитозоле. В одном варианте осуществления активатор NF-κB, *например* селективный активатор NF-κB, является конститутивно активным. В одном варианте осуществления активатор NF-κB, *например* селективный активатор NF-κB, не является конститутивно активным. В одном варианте осуществления селективный активатор NF-κB активируется введением индуктора (*например*, димеризатора). В одном варианте осуществления селективный активатор NF-κB представляет собой vFLIP K13, NEMO-K277A или их производные. Нативные TCR и NF-κB стимулирующие молекулы экспрессирующие иммунные эффекторные клетки вводят пациенту. В одном аспекте ассоциированная с заболеванием клетка представляет собой раковую клетку, инфицированную клетку (*например*, HIV-1-инфицированную клетку) или плазматическую клетку, или В-клетку, или Т клетку.

[00307] В другом варианте осуществления данное изобретение раскрывает способы лечения или профилактики рака, инфекции, аутоиммунных или аллергических заболеваний путем предоставления субъекту, нуждающемуся в этом, иммунных эффекторных клеток (*например*, Т-клеток) или стволовых клеток, которые могут дать начало иммунным эффекторным клеткам, которые сконструированы, чтобы экспрессировать встречающийся в природе (*например*, нативный TCR) или не встречающийся в природе иммунный рецептор (*например*, CAR и/или рекомбинантный TCR) по данному раскрытию и/или NF-κB стимулирующую молекулу. В некоторых вариантах осуществления, активность CAR-Т или TCR-Т клетках может контролироваться с использованием растворимой в воде соли дасатиниба.

[00308] В другом аспекте предложен способ лечения субъекта, *например* снижения или ослабления гиперпролиферативного расстройства или состояния (*например*, рака), *например* солидной/твердой опухоли, опухоли мягких тканей, рака крови или

метастатического поражения, у субъекта нуждающегося в этом.

[00309] В еще одном варианте осуществления данное раскрытие относится к способу лечения заболевания у субъекта. Способ включает введение субъекту клетки, экспрессирующей встречающийся в природе и/или не встречающийся в природе иммунный рецептор (*например*, CAR и/или рекомбинантный TCR) по данному раскрытию и/или NF-κB стимулирующей молекула по данному раскрытию таким образом, что болезнь лечится у субъекта. В одном аспекте способ включает введение субъекту клетки, экспрессирующей ее эндогенный (или нативный) TCR, и NF-κB стимулирующей молекулы по данному изобретению, так что заболевание лечится у субъекта. В одном аспекте заболевание, связанное с экспрессией ассоциированного с заболеванием антигена, как описано в данном документе, представляет собой инфекционное заболевание. В одном аспекте инфекционное заболевание представляет собой заболевание, связанное с заражением такими агентами как HIV1, ВИЧ2, HTLV1, вирус Эпштейна-Барра (EBV), цитомегаловирус (CMV), аденовирус, адено-ассоциированный вирус, вирус ВК, герпесвирус 6 человека, герпесвирус 8 человека, вирус гриппа, вирус парагриппа, вирус птичьего гриппа, коронавирусы MERS и SARS, вирус Конго-Крымской геморрагической лихорадки, рино вирус, энтеровирус, вирус Денге, вирус Западного Нила, вирус Эбола, вирус Марбург, вирус лихорадки Ласса, Зика вирус, RSV, вирус кори, вирус паротита, риновирус, вирус ветряной оспы, вирус простого герпеса 1 и 2, вирус ветряной оспы, HIV-1, HTLV1, вирус гепатита, энтеровирус, вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирусы лихорадки Нипах и долины Рифт, вирус японского энцефалита, микобактерии туберкулеза, атипичные виды микобактерий, *Pneumocystis jirovecii*, токсоплазма, риккетсия, нокардия, аспергиллюс, мукор или кандиды.

[00310] В некоторых вариантах осуществления не встречающийся в природе иммунный рецептор (*например*, CAR и/или TCR) специфически связывается с антигеном HIV. В некоторых вариантах осуществления антиген HIV представляет собой антиген HIV-1. В некоторых вариантах осуществления антиген HIV представляет собой белок оболочки HIV или его часть. В некоторых вариантах осуществления антиген HIV представляет собой gp120 или его часть. В некоторых вариантах осуществления антиген HIV представляет собой сайт связывания CD4 на gp120. В некоторых вариантах осуществления антиген HIV является CD4-индуцированным сайтом связывания на gp120. В некоторых вариантах осуществления антиген HIV представляет собой N-гликан на gp120. В некоторых вариантах осуществления антиген HIV представляет собой V2 gp120. В некоторых вариантах осуществления антиген HIV представляет собой мембранную проксимальную область на gp41.

[00311] Данное раскрытие включает в себя тип клеточной терапии, при которой иммунные эффекторный клетки (*например*, Т-клетки или стволовые клетки, которые дают Т-клетки) генетически модифицированы для экспрессии CAR или TCR по данному изобретению и/или NF-κB стимулирующей молекулы, и CAR-экспрессирующая Т клетка или стволовая клетка вводятся реципиенту, нуждающемуся в этом. Данное раскрытие

также включает тип клеточной терапии, при которой иммунные эффекторныe клетки (*например*, Т клетки или стволовые клетки, которые дают начало Т клеткам) генетически модифицированы для экспрессии NF-κB стимулирующей молекулы, и такие клетки вводят реципиенту, нуждающемуся в этом. Введенные клетки способны уничтожать ассоциированные с заболеванием клетки (*например*, опухолевые клетки или клетки, инфицированные вирусом) у реципиента. В отличие от антителотерапии, модифицированные активатором NF-κB иммунные эффекторныe клетки (*например*, Т клетки, стволовые клетки) способны реплицироваться *in vivo*, что приводит к длительной персистенции, что может привести к устойчивому контролю опухоли. В различных аспектах модифицированные активатором NF-κB иммунные эффекторныe клетки (*например*, Т клетки или стволовые клетки, которые могут давать начало Т клеткам), вводимые пациенту или их потомству, 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 Т клетки или стволовых клеток пациенту.

[00312] Данное раскрытие также включает тип клеточной терапии, при которой стволовые клетки (*например*, гемопоэтические стволовые клетки или лимфоидные стволовые клетки или эмбриональные стволовые клетки или индуцированные плюрипотентные стволовые клетки), которые способны давать начало иммунным эффекторным клеткам (*например*, Т клеткам), сконструированы таким образом, чтобы экспрессировать не встречающийся в природе иммунный рецептор (*например*, CAR и/или TCR) по данному раскрытию и/или NF-κB стимулирующую молекулу, и вводят реципиенту, нуждающемуся в этом. Введенные стволовые клетки после трансплантации реципиенту дают начало иммунным эффекторным клеткам (*например*, Т клеткам), которые (*т.е.* иммунные эффекторныe клетки) способны уничтожать ассоциированные с болезнью клетки реципиента. Таким образом, в различных аспектах иммунные эффекторныe клетки (*например*, Т-клетки), которые продуцируются у пациента после введения стволовых клеток экспрессирующих CAR/NFκB- активатор, сохраняются у пациента в течение по меньшей мере одной недели, 2 недель, 3 недель, одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, 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, пяти лет, десяти лет или двадцати лет после введения Т клеток или стволовых клеток пациенту. Данное изобретение также включает в себя тип клеточной терапии, при которой стволовые клетки, которые способны породить иммунные

эффекторные клетки (*например*, Т клетки) были сконструированы, чтобы экспрессировать не встречающийся в природе иммунный рецептор (*например*, CAR и/или TCR) по данному раскрытию и/или NF-κB стимулирующей молекулы, и дифференцируются *in vitro* для генерирования иммунных эффекторных клеток, которые вводят реципиенту, нуждающемуся в этом. Введенные иммунные эффекторные клетки (*например*, Т клетки) после инфузии реципиенту способны уничтожить ассоциированные с болезнью клетки реципиента. Таким образом, в различных аспектах иммунные эффекторные клетки (*например*, Т клетки), которые вводят пациенту, сохраняются у пациента в течение по меньшей мере 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, одной недели, 2 недель, 3 недель, одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, 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, пяти лет, десяти лет или двадцати лет.

[00313] Данное раскрытие включает в себя тип клеточной терапии, при которой иммунные эффекторные клетки (*например*, Т клетки или стволовые клетки, которые дают начало Т клеткам) генетически модифицированы для экспрессии CAR, нацеленных на два или более различных антигена в одной и той же клетке и Т клетке или стволовой клетке водятся реципиенту, нуждающемуся в этом. В одном варианте осуществления по меньшей мере один из CAR нацелен на антиген, экспрессируемый в гемопоэтических клетках. В одном варианте осуществления по меньшей мере один из CAR нацелен на антиген, выбранный из группы CD19, CD20, CD22, BCMA, CS1, CD138, Lym1, Lym2, CD33 и CD123. В одном варианте осуществления по меньшей мере один из CAR нацелен на антиген, экспрессируемый на гемопоэтических клетках, и по меньшей мере один другой CAR нацелен на антиген, экспрессируемый на твердых опухолях. В одном варианте осуществления по меньшей мере один из CAR нацелен на антиген, выбранный из группы CD19, CD20, CD22, BCMA, CS1, CD138, Lym1, Lym2, CD33 или CD123, и по меньшей мере один другой CAR нацелен на антиген, выбранный из группы мезотелин, Her2, рецептор фолата 1, ROR1, IL13Ra2, AFP, WT1, Ras, NY-ESO-1, DLL3, CD70 и PTK7. В варианте осуществления по меньшей мере один из CAR является SIR. В варианте осуществления по меньшей мере один из CAR является Ab-TCR. В варианте осуществления по меньшей мере один из CAR является SIR, а другой CAR является TFP CD3ε/γ/δ. В варианте осуществления по меньшей мере один из CAR представляет собой Ab-TCR, а другой CAR представляет собой TFP CD3ε/γ/δ. В одном варианте осуществления клетки обладают нарушенной экспрессией по меньшей мере одной из нативных цепей TCR. Данное раскрытие также включает тип клеточной терапии, при которой иммунные эффекторные клетки (*например*, Т клетки или стволовые клетки, которые дают начало Т клеткам) генетически модифицированы для экспрессии CAR, нацеленных на два разных антигена, и NF-κB стимулирующую молекулу, и такие клетки

вводят реципиенту, нуждающемуся в этом. В варианте осуществления клетки являются аутологичными, тогда как в других вариантах осуществления клетки являются аллогенными. Введенные клетки способны уничтожать ассоциированные с заболеванием клетки (*например*, опухолевые клетки или клетки, инфицированные вирусом) у реципиента.

[00314] В отношении *ex vivo* иммунизации по меньшей мере, одно из следующих действий происходит *in vitro* перед введением клетки млекопитающему: i) размножение клеток, ii) введение нуклеиновой кислоты, кодирующей не встречающийся в природе иммунный рецептор (*например*, CAR и/или TCR) по данному раскрытию и/или NF- κ B стимулирующей молекулы клеткам или iii) криоконсервация клеток.

[00315] Процедуры *ex vivo* хорошо известны в данной области и более подробно обсуждаются ниже. Вкратце, клетки выделяют из млекопитающего (*например*, человека) и генетически модифицируют (*т.е.* трансдуцируют или трансфицируют *in vitro*) одним или несколькими векторами, которые экспрессируют не встречающийся в природе иммунный рецептор (*например*, CAR и/или TCR) по данному раскрытию и/или NF- κ B стимулирующую молекулу раскрытую в данном документе. Модифицированные не встречающимся в природе иммунным рецептором (*например*, CAR и/или TCR) и NF- κ B активатором клетки могут быть введены реципиенту-млекопитающему, чтобы обеспечить терапевтический эффект. Реципиентом-млекопитающим может быть человек, и модифицированные не встречающимся в природе иммунным рецептором (*например*, CAR и/или TCR) и NF- κ B активатором клетки могут быть аутологичными по отношению к реципиенту. Альтернативно, клетки могут быть аллогенными, сингенными или ксеногенными по отношению к реципиенту.

[00316] Процедура экспансии *ex vivo* гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников описана в патенте США № 5199942, который включен в данное описание посредством ссылки, и может быть применен к клеткам по данному изобретению. Другие подходящие способы известны в данной области, поэтому данное изобретение не ограничено каким-либо конкретным способом экспансии *ex vivo* клеток. Вкратце, культура *ex vivo* и экспансия иммунных эффекторных клеток (*например*, Т-клеток) включает: (1) сбор CD34⁺ гемопоэтических стволовых и клеток-предшественников у млекопитающего из периферической крови или эксплантатов костного мозга; и (2) размножение таких клеток *ex vivo*. В дополнение к клеточным факторам роста, описанным в пат. 5199942, другие факторы, такие как flt3-L, IL-1, IL-3 и c-kit-лиганд, могут быть применены для культивирования и размножения клеток.

[00317] Как правило, клетки, активированные и размноженные, как описано в данном документе, могут быть применены для лечения и профилактики заболеваний, которые возникают у людей с ослабленным иммунитетом. В определенных аспектах клетки по данному изобретению используются при лечении пациентов с риском развития заболеваний, расстройств и состояний, связанных с экспрессией ассоциированного с заболеванием антигена, как описано в данном документе. Таким образом, данное

изобретение относится к способам лечения или профилактики заболеваний, расстройств и состояний, связанных с экспрессией ассоциированного с заболеванием антигена, как описано в данном документе, включающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества модифицированных CAR/TCR/NF-κB стимулирующая молекула иммунных эффекторных клеток (*например*, Т клеток) или стволовых клеток, которые способны генерировать иммунные эффекторные клетки по данному изобретению.

[00318] В одном аспекте клетки по данному раскрытию, экспрессирующие стимулирующую молекулу CAR/TCR/NF-κB, могут быть применены для лечения пролиферативного заболевания, такого как рак или злокачественное новообразование, или предракового состояния, такого как миелодисплазия, миелодиспластический синдром или предварительный лейкоз. Кроме того, заболевание, связанное с экспрессией ассоциированного с раком антигена, как описано в данном документе, включает, но не ограничивается ими, *например*, атипичные и/или неклассические раковые заболевания, злокачественные новообразования, предраковые состояния или пролиферативные заболевания, экспрессирующие связанный с раком антиген, как описано в данном документе. Показания, не связанные с раком, связанные с экспрессией ассоциированного с заболеванием антигена, как описано в данном документе, включают, но не ограничиваются ими, *например*, аутоиммунное заболевание (*например*, волчанка), воспалительные расстройства (аллергия и астма), инфекционные состояния (*например*, HIV1, CMV, EBV, грипп) и трансплантация.

[00319] CAR/TCR/NF-κB стимулирующие молекулы, модифицированные иммунными эффекторными клетками (*например*, Т-клетками) по данному изобретению, могут быть введены либо отдельно, либо в виде фармацевтической композиции в комбинации с разбавителями и/или с другими компонентами, такими как IL-2 или другие цитокины или клеточные популяции.

[00320] Гематологический рак или рак крови представляют собой такие типы рака, как лейкоз, лимфома и злокачественные лимфопролиферативные состояния, которые влияют на кровь, костный мозг и лимфатическую систему.

[00321] Лейкоз может быть классифицирован как острый лейкоз и хронический лейкоз. Острый лейкоз может быть далее классифицирован как острый миелогенный лейкоз (ОМЛ) и острый лимфолейкоз (ОЛЛ). Хронический лейкоз включает в себя хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ) и хронический лимфолейкоз (ХЛЛ). Другие сопутствующие состояния включают миелодиспластические синдромы (МДС, ранее известные как «прелейкоз»), которые представляют собой разнообразную совокупность гематологических состояний, объединенных неэффективной продукцией (или дисплазией) миелоидных клеток крови и риском трансформации в ОМЛ.

[00322] Лимфома - это группа опухолей клеток крови, которые развиваются из лимфоцитов. Иллюстративные лимфомы включают не-Ходжкинскую лимфому и лимфому Ходжкина.

[00323] Данное изобретение относится к композициям и способам лечения и профилактики рака. В одном аспекте рак представляет собой гематологический рак или рак крови, включая, но не ограничиваясь ими, гематологический рак, такой как лейкоз или лимфома. В одном аспекте CAR/TCR/NF - κB-экспрессирующие клетки по данному изобретению могут быть применены для лечения раковых заболеваний и злокачественных опухолей, таких как, но не ограничиваясь ими, *например*, острые лейкозы, включая, но не ограничиваясь ими, *например*, В-клеточный острый лимфолейкоз («BALL»), Т-клеточный острый лимфолейкоз («TALL»), острый лимфолейкоз (ALL); одного или большего количества хронических лейкозов, включая, но не ограничиваясь ими, *например*, хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ); дополнительных гематологических раковых заболеваний или гематологических состояний, включая, но не ограничиваясь ими, *например*, пролимфоцитарный лейкоз В-клеток, бластное плазмцитоподобное дендритное новообразование клеток, лимфому Беркитта, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, лейкоз ворсистых клеток, мелкоклеточную или крупноклеточную фолликулярную лимфому, злокачественные лимфопролиферативные состояния, MALT-лимфому, лимфому мантийных клеток, лимфому маргинальной зоны, множественную миелому, миелодисплазию и миелодиспластический синдром, не-Ходжкинскую лимфому, плазмобластную лимфому, плазмцитоподобную неоплазму дендритных клеток, макроглобулинемию валденсторма и “прелейкемию”, которые являются разнообразным набором гематологических состояний, объединенных неэффективной продукцией (или дисплазией) миелоидных клеток крови и тому подобного. Кроме того, заболевания, связанные с экспрессией ассоциированного с раком антигена, как описано в данном документе, включают, но не ограничиваются ими, *например*, атипичные и/или неклассические раковые заболевания, злокачественные новообразования, предраковые состояния или пролиферативные заболевания, экспрессирующие ассоциированный с раком антиген, как описано в данном документе.

[00324] Данное раскрытие изобретения предоставляет способ введения субъекту эффективного количества клеток, *например*, иммунных эффекторных клеток или их популяции, каждая клетка содержит не встречающийся в природе иммунный рецептор (*например*, CAR и/или TCR) и/или NF-κB стимулирующую молекулу, необязательно, в сочетании с агентом, который повышает эффективность и/или безопасность иммунной клетки. В различных вариантах осуществления агент, который повышает эффективность и/или безопасность иммунной клетки, выбран из группы, состоящей из (i) ингибитора протеинфосфатазы; (ii) ингибитор киназы; (iii) цитокина; (iv) ингибитора молекулы, ингибирующей иммунитет; (v) агента, который снижает уровень или активность T_{REG}-клеток; (vi) агента, который увеличивает пролиферацию и/или сохранение клеток модифицированных CAR/NF-κB стимулирующей молекулой; (vii) хемокина; (viii) агента, который увеличивает экспрессию CAR/TCR; (ix) агента, который позволяет регулировать экспрессию или активность CAR; (x) агента, который позволяет контролировать

выживание и/или устойчивость измененных клеток; (xi) агента, который контролирует побочные эффекты модифицированных клеток; (xii) ингибитора Brd4; (xiii) средства, которое доставляет терапевтическое средство (*например*, sHVEM) или профилактическое средство к месту заболевания; (xiv) агента, который увеличивает экспрессию целевого антигена, против которого направлен CAR; (xv) антагониста рецептора аденозина A2a; и (xvi) любой комбинации (i) - (xv).

[00325] В некоторых вариантах осуществления заболевание, подлежащее лечению или профилактике, представляет собой гематологический рак. В других вариантах осуществления гематологический рак представляет собой лейкоз. Неограничивающие примеры острых лейкозов включают В-клеточный острый лимфолейкоз («BALL»), Т-клеточный острый лимфолейкоз («TALL»), острый лимфолейкоз (ALL); одного или большего количества хронических лейкозов, включая, но не ограничиваясь ими, *например*, хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ); дополнительных гематологических раковых заболеваний или гематологических состояний, включая, но не ограничиваясь ими, *например*, пролимфоцитарный лейкоз В-клеток, бластное плазмоцитоидное дендритное новообразование клеток, лимфому Беркитта, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, лейкоз ворсистых клеток, мелкоклеточную или крупноклеточную фолликулярную лимфому, злокачественные лимфопролиферативные состояния, MALT-лимфому, лимфому мантийных клеток, лимфому маргинальной зоны, множественную миелому, миелодисплазию и миелодиспластический синдром, не-Ходжкинскую лимфому, плазмобластную лимфому, плазмоцитоидную неоплазму дендритных клеток, макроглобулинемию валденсторма и “прелейкемию”, которые являются разнообразным набором гематологических состояний, объединенных неэффективной продукцией (или дисплазией) миелоидных клеток крови, и заболеваний, связанных с экспрессией опухолевого антигена, описанного в данном документе, включают, но не ограничиваются ими, атипичные и/или неклассические раковые заболевания, злокачественные новообразования, предраковые состояния или пролиферативные заболевания экспрессирующие опухолевый антиген по данному описанию и любую их комбинацию. В другом варианте осуществления заболевание, связанное с опухолевым антигеном, описанным в данном документе, представляет собой солидную/твердую опухоль.

[00326] В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген, связанный с заболеванием, выбран из: CD5; CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS-1 (также называется как подгруппа 1 CD2, CRACC, SLAMF7, CD319 и 19A24); лектиноподобной молекулы 1 С-типа (CLL-1 или CLECL1); CD33; рецептора эпидермального фактора роста, вариант III (EGFRviii); ганглиозида G2 (GD2); ганглиозида GD3 (aNeu5Ac (2-8), aNeu5Ac (2-3) bDGalp (1-4) bDGlc (1-1) Cer); белка созревания В-клеток члена семейства рецепторов TNF (BCMA); антигена Tn ((Tn Ag) или (GalNAc α -Ser/Thr)); простат-специфического мембранного антигена (PSMA); рецепторного тирозинкиназоподобного орфанного рецептора 1 (ROR1); Fms подобной тирозинкиназы 3 (FLT3); связанного с

опухолью гликопротеина 72 (TAG72); CD38; CD44v6; гликозилированного эпитопа CD43, экспрессируемого на клетках острого лейкоза или лимфомы, но не на гематопоэтических предшественниках, гликозилированного эпитопа CD43, экспрессируемого на клетках негематопоэтических раковых заболеваний, карциноэмбрионального антигена (CEA); молекулы адгезии эпителиальных клеток (EPCAM); B7H3 (CD276); KIT (CD117); субъединицы рецептора интерлейкина-13 альфа-2 (IL-13Ra2 или CD213A2); мезотелина; рецептора интерлейкина 11 альфа (IL-11Ra); антигена стволовых клеток простаты (PSCA); протеиназы серина 21 (тестизина или PRSS21); рецептора сосудистого эндотелиального фактора роста 2 (VEGFR2); антигена Льюиса (Y); CD24; бета-рецептора фактора роста, полученного из тромбоцитов (PDGFR-бета); стадийно-специфического эмбрионального антигена-4 (SSEA-4); CD20; альфа-рецептора фолата; рецепторной тирозин-протеинкиназы ERBB2 (Her2/neu); муцина 1, связанного с клеточной поверхностью (MUC1); рецептора эпидермального фактора роста (EGFR); молекулы адгезии нервных клеток (NCAM); простаза; простатической кислой фосфатазы (PAP); мутированного фактора удлинения 2 (ELF2M); эфрина B2; белка активации фибробластов альфа (FAP); рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (рецептора IGF-I), карбоангидразы IX (CAIX); субъединицы протеасомы (просомы, макропаина), бета-тип а, 9 (LMP2); гликопротеина 100 (gp100); слитого белка-онкогена, состоящего из кластерной области точки разрыва (BCR) и гомолога 1 вирусного онкогена мышшиной лейкозы Абельсона (Abl) (bcr-abl); тирозиназы; рецептора 2 эфрина типа A (EphA2); фукозила GM1, молекулы адгезии сиалил Льюиса (sLe); ганглиозида GM3 (aNeu5Ac (2-3) bDCIalp (1-4) bDGIcp (1-1) Cer); трансглутаминазы 5 (TGS5); высокомолекулярного антигена, ассоциированного с меланомой (HMWMAA); о-ацетил-GD2 ганглиозида (OAcGD2); эндотелиального маркера 1 опухоли (TEM1/CD248); эндотелиального маркера 7 опухоли (TEM7R); клодина 6 (CLDN6); рецептора гормонов, стимулирующих щитовидную железу (TSHR); рецептора, связанного с G белком, класса C, группы 5, члена D (GPRC5D); открытая рамка считывания 61 хромосомы X (CXORF61); CD97; CD179a; киназы анапластической лимфомы (ALK); полисиаловой кислоты; специфичной для плаценты 1 (PLAC1); гексахаридной части globoH гликоцерамида (GloboH); антигена дифференцировки молочной железы (NY-BR-1); уроплакина 2 (UPK2); клеточного рецептора вируса гепатита А 1 (HAVCR1); адренорецептора бета 3 (ADRB3); паннексина 3 (PANX3); G-белок-связанного рецептора 20 (GPR20); комплекса антигена 6 лимфоцитов, локуса К 9 (LY6K); обонятельного рецептора 51E2 (OR51E2); белка альтернативной рамки считывания TCR гамма (TARP); белка опухоли Вильмса (WT1); антигена 1 рака/яичка (NY-ESO-1); антигена 2 рака/яичка (LAGE-1a); ассоциированного с меланомой антигена 1 (MAGE-A1); вариантного гена 6 ETS транслокации, расположенного на хромосоме 12p (ETV6-OMJ); белка спермы 17 (SPA17); члена 1A семейства X антигенов (XAGE1); ангиопэтинсвязывающего рецептора 2 клеточной поверхности (Tie 2); антигена-1 яичка рака меланомы (MAD-CT-1); антигена-2 яичка рака меланомы (MAD-CT-2); Fos-связанного антигена 1; опухолевого белка p53 (p53); мутанта p53; простерина; сурвивина;

теломеразы; опухолевого антигена-1 рака карциномы простаты (PCT A-1 или Galectin 8), антигена 1 меланомы, распознаваемого Т-клетками (MelanA или MART1); мутанта крысиной саркомы (Ras); обратной транскриптазы теломеразы человека (hTERT); точек разрыва саркомы; ингибитора апоптоза меланомы (ML-IAP); ERG (ген слияния трансмембранной протеазы серина 2 (TMPRSS2), ETS); N-ацетилглюкозаминилтрансферазы V (NA17); белка с парными боксами Pax-3 (PAX3); андрогенного рецептора; циклина B1; гомолога, полученного из нейробластомы, вирусного онкогена v-мус птичьего миелоцитоматоза (MYCN); члена С семейства Ras гомологов (RhoC); родственного тирозиназе белка 2 (TRP-2); цитохрома P450 1B 1 (CYP1B 1); подобного CCCTC-связывающему фактору (белку с цинковыми пальцами) (BORIS или брат регулятора сайтов импринтинга), антигена 3 плоскоклеточной карциномы, распознаваемого Т-клетками (SART3); белка с парными боксами Pax-5 (PAX5); проакрозин-связывающего белка sp32 (OY-TE51); лимфоцит-специфической протеинтирозинкиназы (LCK); якорного белка 4 киназы А (AKAP-4); Х точки разрыва 2 синовиальной саркомы (SSX2); рецептора конечных продуктов усиленного гликирования (RAGE-1); почечного повсеместного 1 (RU1); почечного повсеместного 2 (RU2); легумаина; вируса папилломы человека Е6 (HPV Е6); вируса папилломы человека Е7 (HPV Е7); кишечной карбоксилэстеразы; мутированного белка теплового шока 70-2 (mut hsp70-2); CD79a; CD79b; CD72; связанного с лейкоцитами иммуноглобулин-подобного рецептора 1 (LAIR1); Fc-фрагмента рецептора IgA (FCAR или CD89); члена 2 подгруппы А лейкоцитарного иммуноглобулиноподобного рецептора (LILRA2); член f семейства, подобного молекуле CD300 (CD300LF); член А семейства 12 доменов лектинов С-типа (CLEC12A); антигена 2 стромальных клеток костного мозга (BST2); белка 2 подобного EGF-подобный модуль-содержащему муцин-подобному рецептору гормонов (EMR2); лимфоцитарного антигена 75 (LY75); глипикана-3 (GPC3); Fc-рецепторо-подобного 5 (FCRL5); и иммуноглобулин лямбда-подобного полипептида 1 (IGLL1), MPL, биотина, с-МЫС эпителиального тэга, CD34, LAMP1 TROP2, GFRalpha4, CDH17, CDH6, NYBR1, CDH19, CD200R, SleA (CA19.9; антиген сиалила Льюиса); Фукозил-GM1, PTK7, gpNMB, CDH1-CD324, DLL3, CD276/B7H3, IL11Ra, IL13Ra2, CD179b-IGL1, ALK TCR гамма-дельта, NKG2D, CD32 (FCGR2A), CSPG4-HMW-MAA, Tim1-/HVFR1, CSF2RA (GMCSFR-альфа), TGFбетаP2, VEGFR2/KDR, Льюис антигена, цепи TCR-бета1, цепи TCR-бета2, цепи TCR-гамма, цепи TCR-дельта, FITC, рецептора леутенизирующего гормона (LHR), рецептора фолликулостимулирующего гормона (FSHR), рецептора гормона хорионического гонадотропина (CGHR), CCR4, SLAMF6, SLAMF4, гликопротеина оболочки HIV1, HTLV1-Tax, CMV pp65, EBV-EBNA3c, гемагглютинирина вируса гриппа А (HA), GAD, PDL1, гуанилил циклазы С (GCC), белка KSHV-K8.1, белка KSHV-gH, аутоантитела к десмоглеину 3 (Dsg3), аутоантитела к десмоглеину 1 (Dsg1), HLA, HLA-A, HLA-A2, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA -DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, HLA-G, IGE, CD99, RAS G12V, тканевого фактора 1 (TF1), AFP, GPRC5D, Клаудина18.2 (CLD18A2 или CLDN18A.2), Р- гликопротеина, STEAP1, LIV1, нектин-4, Крипто, GPA33, BST1/CD157,

хлоридного канала с низкой проводимостью и антигена, распознаваемого антителом TNT.

[00327] В некоторых вариантах осуществления заболевание, подлежащее лечению, представляет собой инфекционное заболевание, включая, но не ограничиваясь ими, инфекцию такими агентами, как HIV1, ВИЧ2, HTLV1, вирус Эпштейна-Барра (EBV), цитомегаловирус (CMV), аденовирус, адено-ассоциированный вирус, вирус ВК, герпесвирус 6 человека, герпесвирус 8 человека, вирус гриппа, вирус парагриппа, вирус птичьего гриппа, коронавирусы MERS и SARS, вирус Конго-Крымской геморрагической лихорадки, рино вирус, энтеровирус, вирус Денге, вирус Западного Нила, вирус Эбола, вирус Марбург, вирус лихорадки Ласса, Зика вирус, RSV, вирус кори, вирус паротита, риновирус, вирус ветряной оспы, вирус простого герпеса 1 и 2, вирус ветряной оспы, HIV-1, HTLV1, вирус гепатита, энтеровирус, вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирусы лихорадки Нипах и долины Рифт, вирус японского энцефалита, микобактерии туберкулеза, атипичные виды микобактерий, *Pneumocystis jirovecii*, токсоплазма, риккетсия, нокардия, аспергиллюс, мукор или кандиды. При таких заболеваниях целевой антиген, связанный с заболеванием, выбирают из: гликопротеина оболочки HIV1, gag HIV1, HTLV1-Tax, pp65 CMV, EBV-EBNA3c, гемагглютинаина гриппа А (НА) и GAD.

[00328] Заболевание, которое нужно лечить или предупреждать способами и композициями по данному изобретению, может представлять собой иммунное или дегенеративное заболевание, *например*, сахарный диабет, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, пузырчатку обыкновенную, анкилозирующий спондилит, тиреоидит Хошимото, СКВ, саркоидоз, смешанную склеродерму, болезнь соединительной ткани, болезнь трансплантат против хозяина или болезнь Альцгеймера. В таких вариантах осуществления антиген-мишень, ассоциированный с заболеванием, представляет собой аутоантитело.

[00329] Другие неограничивающие примеры заболеваний, связанных с экспрессией целевого антигена, включают любой из следующих видов рака или родственных состояний: рак толстой кишки, рак прямой кишки, почечно-клеточный рак, рак печени, немелкоклеточный рак легкого, рак тонкой кишки, рак пищевода, меланому, рак костей, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, злокачественную или внутриглазную злокачественную меланому, рак матки, рак яичников, рак прямой кишки, рак анальной области, рак желудка, рак яичка, рак матки, рак маточных труб, рак эндометрия, рак шейки матки, рак влагалища, рак вульвы, болезнь Ходжкина, не-Ходжкинская лимфома, рак эндокринной системы, рак эндокринной системы щитовидной железы, рак околощитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягких тканей, рак мочеиспускательного канала, рак полового члена, твердые опухоли детского возраста, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, рак почечной лоханки, новообразование центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, ангиогенез опухоли, опухоль спинного мозга, глиому ствола головного мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, рак, вызванный окружающей средой, комбинации указанных видов рака и метастатические

поражения указанных видов рака.

[00330] В некоторых вариантах осуществления указанных способов или применений описанных в данном документе, CAR/TCR-экспрессирующие клетки, содержащие не встречающиеся в природе иммунный рецептор (*например*, CAR и/или TCR) и/или NF- κ B стимулирующее молекулы, вводят в комбинации с агентом, который повышает эффективность иммунной эффекторной клетки, *например*, одним или несколькими ингибиторами протеинфосфатазы, ингибитором киназы, цитокином, хемокином, фрагментом scFV, биспецифическим антителом, ингибитором ингибирующей молекулы иммунной системы; клеточным сигнальным белком, вирусным сигнальным белком или агентом, который снижает уровень или активность клетки T_{REG}. Неограничивающие примеры ингибиторов протеинфосфатазы включают ингибитор SHP-1 и/или ингибитор SHP-2. Неограничивающие примеры ингибиторов киназы включают ингибитор CDK4, ингибитор CDK4/6 (*например*, палбоцилиб), ингибитор ВТК (*например*, ибрутиниб или RN-486), ингибитор mTOR (*например*, рапамицин или эверолимус (RAD001)), ингибитор MNK или двойной ингибитор P13K/mTOR. В одном варианте осуществления ингибитор ВТК не снижает и не ингибирует киназную активность интерлейкина-2-индуцируемой киназы (ИТК). Неограничивающие примеры антагониста рецептора A2a включают виаденант. В некоторых вариантах осуществления агент, который ингибирует иммуоингибирующую молекулу, может представлять собой одно или большее количество из антитела или фрагмента антитела, ингибирующей нуклеиновой кислоты, коротких палиндромных повторов регулярно расположенных группами (CRISPR), активатор транскрипции, подобный эффекторной нуклеазе (TALEN) или эндонуклеазу цинкового пальца (ZFN), которые ингибируют экспрессию ингибирующей молекулы. В других вариантах осуществления указанных способов или применений, описанных в данном документе, агент, который снижает уровень или активность клеток TREG, выбирают из циклофосамида, антитела против GITR, деплетирования CD25 или их комбинации. В определенных вариантах осуществления указанных способов или применений, описанных в данном документе, иммуностимулирующая молекула выбрана из группы, состоящей из PD1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, TGFR бета, CEACAM-1, CEACAM-3 и CEACAM-5. В других вариантах осуществления цитокин выбран из IL2, IL-7, IL-15 или IL-21 или любой их комбинации. В других вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка содержащая молекулу, стимулирующую CAR/TCR и/или NF- κ B, и второй агент, *например*, любой из комбинированных терапий, описанных в данном документе (*например*, агент, который увеличивает эффективность иммунной эффекторной клетки), вводятся практически одновременно или последовательно. В одном варианте осуществления данного изобретения цитокин вводят субъекту одновременно (*например*, вводят в тот же день) с или вскоре после введения (*например*, вводят через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней или 7 дней после введения) клетки или популяции клеток, содержащих CAR/TCR и/или NF- κ B стимулирующую молекулу. В других

вариантах осуществления цитокин вводят субъекту через продолжительный период времени (*например* по меньшей мере, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 6 недель, 8 недель, 10 недель или более) после введения клетки или популяции клеток или после оценки ответа субъекта на клетку.

[00331] В других вариантах осуществления данного изобретения клетки, экспрессирующие не встречающийся в природе иммунный рецептор (*например*, CAR и/или TCR) и/или NF-κB стимулирующую молекулу вводят в комбинации с агентом, который облегчает один или более побочных эффектов, связанных с введением клетки, экспрессирующей а CAR/TCR и/или NF-κB стимулирующую молекулу. Побочные эффекты, связанные с экспрессирующей клеткой CAR/TCR и/или NF-κB стимулирующую молекулу, могут быть выбраны из синдрома высвобождения цитокинов (CRS - cytokine release syndrome), гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (HLH - hemophagocytic lymphohistiocytosis) или неврологических осложнений. Примеры таких агентов включают стероиды (*например*, преднизон, дексаметазон), антагонисты IL6R (*например*, тоцилизумаб), антагонисты IL1R (*например*, анакинра), ингибиторы src-киназы (*например*, дазатиниб или водорастворимая соль дазатиниба), ингибитор киназы (*например*, ибрутиниб), ингибиторы кальцинеурина (*например*, такролимус или циклоспорин А) или химиотерапевтические препараты (*например*, циклофосфамид, метотрексат или винкристин).

[00332] В одном варианте осуществления клетки, экспрессирующие не встречающийся в природе иммунный рецептор (*например*, CAR и/или TCR) и/или NF-κB стимулирующую молекулу, вводят в комбинации с низкой, усиливающей иммунитет, дозой ингибитора mTOR. Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что лечение низкой, усиливающей иммунитет, дозой (*например*, доза не полностью подавляет иммунную систему, но является достаточной для улучшения иммунной функции), сопровождается снижением PD-1 положительных Т-клеток или увеличение PD-1-отрицательных клеток. PD-1-положительные Т-клетки, но не PD-1-отрицательные Т-клетки, могут быть деплетированы за счет взаимодействия с клетками, которые экспрессируют лиганд PD-1, *например*, PD-L1 или PD-L2.

[00333] Фармацевтические композиции по данному изобретению могут содержать клетки экспрессирующие не встречающиеся в природе иммунный рецептор (*например*, CAR и/или TCR) и/или NF-κB стимулирующую молекулу, *например*, множество клеток экспрессирующих CAR/TCR и/или NF-κB стимулирующую молекулу, как описано в данном документе, в комбинации с одним или несколькими фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или наполнителями. Такие композиции могут содержать буферы, такие как физиологический раствор с нейтральным буфером, физиологический раствор с фосфатным буфером и т.п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстран, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА или глутатион; адьюванты (*например*, гидроксид алюминия); и консерванты. Композиции данного

раскрытия могут быть приготовлены для внутривенного введения. Композиция может дополнительно содержать вторичный активный агент (*например*, противораковый, противовирусный или антибиотический агент).

[00334] Фармацевтические композиции по данному изобретению могут быть введены способом, соответствующим заболеванию, которое лечат (или предотвращают). Количество и частота введения будут определяться такими факторами, как состояние пациента, а также тип и тяжесть заболевания пациента. Когда указано «иммунологически эффективное количество», «эффективное противоопухолевое количество», «эффективное противоопухолевое количество», или «терапевтическое количество», или «противоинфекционное», количество композиций по данному изобретению для введения может быть определен врачом с учетом индивидуальных различий в возрасте, весе, размере опухоли, степени инфекции или метастазирования и состоянии пациента (субъекта) в зависимости от обстоятельств. В целом можно констатировать, что фармацевтическая композиция, содержащая иммунные эффекторные клетки (*например*, Т клетки, НК - клетки), описанные в данном документе, может быть введена в дозе 10^4 10^9 клеток/кг веса тела, а в некоторых случаях 10^5 10^6 клеток/кг массы тела, в том числе всех целых значений в пределах этих диапазонов. Т-клеточные композиции также могут вводиться несколько раз в этих дозировках. Клетки можно вводить с использованием инфузионных методов, которые широко известны в иммунотерапии (см., *например*, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988).

[00335] В определенных аспектах может быть желательным вводить активированные иммунные эффекторные клетки (*например*, Т клетки, НК-клетки) субъекту, а затем впоследствии повторно отбирать кровь (или проводить аферез), активировать иммунные эффекторные клетки (*например*, Т клетки, НК клетки), в соответствии с данным изобретением, и реинфузировать пациента этими активированными и размноженными иммунными эффекторными клетками (*например*, Т клетками, НК-клетками). Этот процесс может выполняться несколько раз каждые несколько недель. В определенных аспектах иммунные эффекторные клетки (*например*, Т клетки, НК-клетки) могут быть активированы из образцов крови от 10 до 400 см³. В определенных аспектах иммунные эффекторные клетки (*например*, Т клетки, НК-клетки) активируются из образцов крови 20 , 30 , 40 , 50 , 60 , 70 , 80 , 90 или 100 мл.

[00336] В некоторых вариантах осуществления субъекты могут подвергаться лейкоферезу, при котором лейкоциты собирают, обогащают или деплетируют *ex vivo* для отбора и/или выделения интересующих клеток, *например* Т-клеток. Эти изоляты Т-клеток могут быть размножены способами, известными в данной области техники, и обработаны и/или преобразованы таким образом, что может быть введена одна или большее количество конструкций по данному раскрытию, что ведет к получению клеток CAR-T или TCR-T по данному раскрытию, коэкспрессирующей вспомогательный модуль, кодирующий активатор NF-κB. Субъекты, нуждающиеся в этом, могут впоследствии проходить стандартное лечение химиотерапией с высокими дозами с последующей

трансплантацией стволовых клеток периферической крови. В определенных аспектах, после или одновременно с трансплантацией, субъекты получают инфузию размноженных клеток CAR-T или TCR-T согласно данному изобретению, которые необязательно коэкспрессируют вспомогательный модуль, кодирующий активатор NF-κB. В дополнительном аспекте, размноженные клетки вводят до или после хирургической операции.

[00337] Комплекты для практического применения раскрытия также предоставляются. Например, наборы для лечения рака у субъекта, или создания клеток, которые экспрессируют не встречающийся в природе иммунный рецептор (*например, CAR и/или TCR*) и/или NF-κB стимулирующие молекулы раскрытые в данном описании. Наборы могут включать в себя по меньшей мере, одну молекулу или вектор, кодирующие нуклеиновую кислоту не встречающийся в природе иммунный рецептор (*например, CAR и/или TCR*) и/или NF-κB стимулирующие молекулы наряду с методом, для введения указанной нуклеиновой кислоты в иммунные эффекторные клетки. Набор может включать в себя вирус, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую не встречающийся в природе иммунный рецептор (*например, CAR и/или TCR*) и/или NF-κB стимулирующую молекулу и химические вещества, такие как полибрен, для повышения вирусной трансдукции. Набор может содержать компоненты для изоляции T клеток для экспрессии не встречающегося в природе иммунного рецептора (*например, CAR и/или TCR*). Альтернативно, набор может содержать иммунные эффекторные клетки (*например, T клетки или НК клетки*) или стволовые клетки, экспрессирующих не встречающийся в природе иммунный рецептор (*например, CAR и/или TCR*) и/или NF-κB стимулирующую молекулу. Более одного из раскрытых не встречающийся в природе иммунных рецепторов (*например, CAR и/или TCR*) и/или NF-κB стимулирующих молекул могут быть включены в набор. Набор может включать контейнер и этикетку или вкладыш в упаковке или связанный с контейнером.

[00338] Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и *т. д.* Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер обычно содержит композицию, включающую одну или большее количество молекул нуклеиновой кислоты, вирусов, векторов, T-клеток и *т. д.* В нескольких вариантах осуществления контейнер может иметь стерильный порт доступа (*например, контейнер может представлять собой мешок для внутривенного раствора или флакон, имеющий пробку, прокалываемую иглой для подкожных инъекций*). Этикетка или вкладыш в упаковку указывает, что композиция используется для лечения конкретного состояния. Этикетка или вкладыш в упаковку, как правило, дополнительно включают инструкции по применению раскрытых компонентов, например, в способе лечения или профилактики опухоли или получения клетки CAR-T. Вставка пакета обычно включает инструкции, обычно включаемые в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировке, введении, противопоказаниях и/или предупреждениях относительно использования таких

терапевтических продуктов. Учебные материалы могут быть написаны в электронном виде (например, компьютерная дискета или компакт-диск) или могут быть визуальными (например, видеофайлы). Наборы могут также включать дополнительные компоненты для облегчения конкретного применения, для которого предназначен набор. Так, например, набор может дополнительно содержать средство для измерения экспрессии CAR и/или NF-κB стимулирующей молекулы в Т клетках, или определения количества или процента Т клеток, которые экспрессируют CAR и/или NF-κB стимулирующую молекулу или определение функциональности клеток. Наборы могут дополнительно содержать буферы и другие реагенты, обычно используемые для практики конкретного способа. Такие наборы и соответствующее содержимое хорошо известны специалистам в данной области.

[00339] Данное раскрытие дополнительно описано со ссылкой на следующие экспериментальные примеры. Эти примеры приведены только в целях иллюстрации и не предназначены для ограничения, если не указано иное. Таким образом, данное раскрытие никоим образом не должно быть истолковано как ограниченное следующими примерами, а, скорее, должно быть истолковано, чтобы охватить любые и все варианты, которые стали очевидными в результате изложения, предоставленного в данном документе.

ПРИМЕРЫ

[00340] Линии клеток, сконструированные для экспрессии люцифераз (*например*, GLuc или NLuc) для измерения цитотоксичности различных конструкций, нацеленных на разные клеточные поверхности и внутриклеточные антигены, представлены в **Таблице А**. Клеточные линии, используемые в этих экспериментах, целевые антигены на клеточных линиях и их среды для роста продемонстрированы в следующей **Таблице А**. Клетки культивировали при 37°C, в 5% CO₂ увлажненном инкубаторе. Клеточные линии были получены от ATCC, NIH СПИД программы реагентов или были доступны в лаборатории.

[00341] **Таблица А:**

Клеточная линия	Условия культуры	Иллюстративные экспрессированные целевые антигены CAR
BC-1	RPMI, 20% FCS	BCMA, GPRC, CD138
BC-3	RPMI, 20% FCS	BCMA, GPRC, CD138
BCBL-1	RPMI, 20% FCS	GPRC, CD138
JSC-1	RPMI, 20% FCS	GPRC, CD138
MM1S	RPMI, 10% FCS	CD38, GPRC, CD44, CD200R
U266	RPMI, 10% FCS	BCMA, WT1/HLA-A2+, CS1, CLL1, CD138, c-MET, IL6R, CD179b, NY-ESO/HLA-A2, NYBR, LAMP1

L363	RPMI, 10% FCS	BCMA, GPRC, WT1/HLA-A2+, CS1, CLL1, CD138, NY-ESO/HLA-A2, NYBR, LAMP1
K562	RPMI, 10% FCS	CD33, IL1Ra, TnAg
BV173	RPMI, 10% FCS	CD123, CD179b, IL1Ra, WT1/HLA-A2+, CXCR4, FLT3, CD179a
Nalm6	RPMI, 10% FCS	CD19, CD20, CD22, CD179b, CD179a
HL60	RPMI, 10% FCS	CD33, CD34, CLL1, IL6R, CD32, CD179
U937	RPMI, 10% FCS	CD4, CLL1
RS: 411	RPMI, 20% FCS	CD19, бета-рецептор фолата (FRbeta), TGFbeta, CD179b, NKG2DNKG2D, FLT3, CD179a
MV: 411	RPMI, 10% FCS	FLT3, CD123, FRbeta
Raji	RPMI, 10% FCS	CD19, CD20, CD22, BCMA, CD38, CD70, CD79, бета-рецептор фолата, CLL1
HEL-92.1.7 (HEL)	RPMI, 10% FCS	MPL, CD33, CD32, CD200R
Jurkat	RPMI, 10% FCS	TnAg, TSLRP, TSHR, CD4, CD38
Daudi	RPMI, 10% FCS	BCMA, FRbeta
REC-1	RPMI, 10% FCS	NKG2DNKG2D, ROR1
KG-1	RPMI, 20% FCS	CD33, CD34, CD123, ЦЛРП
CEM	RPMI, 10% FCS	CD5, CD43
U937	RPMI, 10% FCS	CD4, CLL1
LAMA5	RPMI, 10% FCS	WT1/HLA-A2
A549	DMEM, 10% FCS	ROR1, CD22, TIM1, CDH17
HT29	DMEM, 10% FCS	EGFR, SLEA, c-MET
Molm-13	RPMI, 20% FCS	FLT3, IL6R, LAMP1, TSLRP, CD4, CSF2RA,

		CXCR4, IL6R, CSF2RA, GPC3
A431	DMEM, 10% FCS	EGFR, альфа-рецептор фолата, Her3
P19	DMEM, 10% FCS	ССЭА
THP-1	RPMI, 10% FCS	CD32, CD33, CXCR4, CD123, CD44, IL6R, бета-рецептор фолата, CD70, LAMP1, FLT3, CSF2RA
U87MG	DMEM, 10% FCS	CD276, gpNMB, IL13RA2
LoVo	DMEM, 10% FCS	Тканевой фактор, CDH17, EGFR
SKOV-3	DMEM, 10% FCS	Альфа-рецептор фолата (FR1), FSHR, Her2, Her3, LHR, MSLN, TIM1, EPCAM
NCI-H1993	DMEM, 10% FCS	EGFR
Kasumi-1	RPMI, 20% FCS	CLEC5A, PR1/HLA-A2, TGFбета,
Jeko-1	RPMI, 20% FCS	BCMA, ROR1
PC-3	DMEM, 10% FCS	CGH, TROP2, PSCA, PSMA. EPCAM, FSHR, CLD18A2 (CLDN18.2)
HeLa	DMEM, 10% FCS	EGFR, FR1, MSLN, TSHR
LnCAP	DMEM, 10% FCS	EGFR, FSHR, PSCA, PSMA, CD22, Her3, CD22, LHR, CLD18A2 (CLDN18.2)
OVCAR-3	DMEM, 10% FCS	B7H4, CDH6, DLL3, FR1, FSH, LHR, MSLN, PTK7, TnAg, TSHR, L1CAM
MEL-624	DMEM, 10% FCS	CDH19, GD2, GD3, gp100/HLA-A2, gpNMB, HMWMAA, NYESO/HLA-A2, MART1/HLA-A2
LS174-T	DMEM, 10% FCS	CEA
MEL-526	DMEM, 10% FCS	GD2
MDA-MB231	DMEM, 10% FCS	CD324, Muc1
L1236	RPMI, 20% FCS	CD30, CD23, PDL1

L428	RPMI, 20% FCS	CD30, CD123, CCR4, PDL1
L540	RPMI, 20% FCS	CD30, CCR4, PDL1
Molt-16	RPMI, 20% FCS	IL1ra, NKG2DNKG2D
CEM	RPMI, 10% FCS	CD5
MG-63	DMEM, 10% FCS	IL13RA2
Karpass-299	RPMI, 20% FCS	Alk, GPRC, PDL1
MCF7	DMEM, 10% FCS	B7D4, CD276, TROP2, Her3, Muc1, LewisY, LHR
AA-2	RPMI, 10% FCS	HIV1 env гликопротеин (gp120)
HL2/3	DMEM, 10% FCS	HIV1 env гликопротеин (gp120)
TF228.1.16	DMEM, 10% FCS	HIV1 env гликопротеин (gp120), CCR4
TT	DMEM, 10% FCS	TGF-бета, TSHR, GFRalpha4
DMS79	RPMI, 10% FCS	Fucosyl-GM1, Slea (CA19.9; Сиалил Льюис Антиген)
LAN-5	DMEM, 10% FCS	ALK, DLL3, GFRalpha4, FUCOSYL-GM1
PEER1	RPMI, 10% FCS	TSHR
SK-MEL-37	DMEM, 10% FCS	DLL3, GD2
F9	DMEM, 10% FCS	SSEA
HepG2	DMEM, 10% FBS	GPC3, AFP/HLA-A2

[00342] Клеточная линия Jurkat (клон Е6-1), созданная с NFAT-зависимым репортерным геном EGFP (или GFP), была подарена доктором Артуром Вейссом из Калифорнийского университета в Сан-Франциско и была описана для изучения передачи сигналов CAR ((Wu, CY) et al., Science 350: 293-302,2015). Клетки Jurkat содержали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% FBS, пенициллина и стрептомицина.

[00343] *Генерация лентивирусных векторов, кодирующих химерные антигенные рецепторы против MPL*

[00344] Вектор pLENTI-Blast был получен из вектора pLenti6v5gw_lacZ (Invitrogen; ThermoFisher Scientific) путем удаления гена LacZ. pLenti-MP2 был подарен Пантелис

Цоулфас (Pantelis Tsoulfas) (плазмида Addgene № 36097) и использовался для создания лентивирусного вектора pLenti-EF1a или pLenti-EF1 α - путем замены промотора CMV промотором EF1 α человека с использованием стандартных способов молекулярной биологии. pLenti-EF1a-DWPRE - был получен из вектора pLENTI-EF1 α путем делеции последовательности WPRE. Внутренний фрагмент Sac II был удален из промотора EF1 α для генерации промотора EF1alpha (EF1a) -D-SACII (SEQ ID NO: 3842). Вектор psPAX2 был подарен Дидье Троне (Didier Trono) (плазмида Addgene № 12260). Плазмида с белком оболочки pLP/VSVG и клетки 293FT были получены от Invitrogen (ThermoFisher Scientific). Вектор ретровирусного переноса MSCVneo, MSCVhygro и MSCVpac и вектор упаковки pKAT были получены из лаборатории доктора Роберта Иллари (Robert Illaria). pHRTK плазмида с ренилла-люциферазой была от Promega.

[00345] Получение векторов, содержащих химерный антигенный рецептор с остовами BBz, CD28z и z-K13, создание и использование слитых белков GGS-NLuc, а также создание и использование репортерных клеточных линий люциферазы (*например*, GLuc) для измерения клеточной цитотоксичности с применением анализа Матадора были описаны ранее (PCT/US2017/024843, PCT/US2017/025602 и PCT/US2017/052344).

[00346] ***Лентивирусные и ретровирусные векторы***

[00347] Лентивирусы были получены путем трансфекции на основе фосфата кальция в клетках 293FT, по существу, как описано ранее (Matta H et al, Cancer biology and therapy. 2 (2): 206-10. 2003). Клетки 293FT выращивали в DMEM с 10% FCS, 4 mM L-глутамином, 0,1 mM MEM с заменимыми аминокислотами, и 1 mM MEM пируватом натрия (обозначаемым как DMEM-10). Для генерации лентивируса клетки 293FT высевали в 10 мл среды DMEM-10 без антибиотиков в 10-см планшет для культивирования тканей, чтобы они были приблизительно на 80% покрытия в день трансфекции. На следующий день клетки трансфицировали методом трансфекции фосфатом кальция с использованием 10 мкг лентивирусной экспрессионной плазмиды, кодирующей разные гены, 7,5 мкг плазмиды PSPAX2 и 2 мкг плазмиды PLP/VSVG. Приблизительно через 15-16 часов после трансфекции 9 мл среды удаляли и заменяли на 5 мл свежей среды. Приблизительно через 48 часов после трансфекции собирали 5 мл супернатанта (первый сбор) и заменяли свежей 5 мл среды. Приблизительно через 72 часа после трансфекции собирали всю среду (вторая коллекция, обычно около 6 мл). Собранные супернатанты объединяли и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 1 минуты, чтобы удалить остатки клеток и неприкрепленные клетки. Бесклеточный супернатант фильтровали через шприцевой фильтр 0,45 мкм. В некоторых случаях супернатант дополнительно концентрировали ультрацентрифугированием при 18500 об/мин в течение 2 часов при 4°C. Вирусный осадок ресуспендировали в 1/10 от исходного объема в среде XVIVO. Вирус либо использовали в свежем виде для заражения клеток-мишеней, либо хранили замороженными в аликвотах при -80°C.

[00348] ***Инфекция T-клеток и МПКК***

[00349] Клетки “кольца” были получены от здоровых не идентифицированных

взрослых доноров из Банка крови в Детской больнице Лос-Анджелеса и использовались для выделения мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) центрифугированием в градиенте Ficoll-Нураque. МКПК либо использовали как таковые, либо использовали для выделения Т-клеток с использованием магнитных микрогранул CD3 (Miltenyi Biotech) и следуя инструкциям производителя. МКПК или выделенные Т-клетки ресуспендировали в среде XVIVO (Lonza), с добавлением 10 нг/мл CD3-антитела, 10 нг/мл CD28-антитела и 100 МЕ рекомбинантного человеческого-IL2. Клетки культивировали при 37°C в инкубаторе с 5% -ным CO₂ с увлажнением. Клетки активировали в вышеуказанной среде за 1 день до заражения лентивирусными векторами. Как правило, первичные клетки (*например*, Т-клетки) инфицировали утром с использованием спин-инфекции (1800 об/мин в течение 90 минут при 37°C с 300 мкл концентрированного вируса, который повторно суспендировали в среде XVIVO в присутствии 8 мкг/мл Polybrene® (Sigma, кат. № H9268). Среда была сменена вечером, и инфекция повторялась в течение еще двух дней в общей сложности 3 инфекции. После 3-й инфекции клетки осаждали и ресуспендировали в свежей среде XVIVO, содержащей 10 нг/мл CD3-антитела, 10 нг/мл CD28-антитела и 100 МЕ рекомбинантного IL2 человека, и добавляли соответствующие антибиотики (если указано) и помещали в колбу для культивирования клеток для селекции, если не указано иное. Клетки культивировали в вышеуказанной среде в течение 10-15 дней, если не использовали селекцию с помощью селектирующего агента, и в течение 20-30 дней, если селекцию с помощью селектирующего агента. В тех случаях, когда клетки были инфицированы EGFP, экспрессирующим лентивирус, они размножались без селекции с помощью селектирующего агента или сортировались с помощью проточной цитометрии для обогащения на EGFP-экспрессирующие клетки. Для заражения раковых клеточных линий примерно 500 000 клеток инфицировали 2 мл неконцентрированного вирусного супернатанта в общем объеме 3 мл с помощью Polybrene® (Sigma, кат. № H9268). Затем на следующее утро клетки осаждали и ресуспендировали в среде с соответствующими антибиотиками и помещали в колбу для культивирования клеток для отбора.

[00350] По существу, для получения ретровирусных векторов использовали процедуру, аналогичную описанной выше, для получения лентивирусных векторов, за исключением того, что клетки 293FT обычно трансфицировали в 10-см планшетах для культуры ткани в 10 мл среды DMEM-10 с использованием 10 мкг ретровирусной конструкции, 4 мкг рКАТ и 2 мкг плазмиды VSVG. Сбор вируса и заражение клеток-мишеней осуществляли, по существу, как описано выше для лентивирусных векторов.

[00351] ***Антитела и агенты для селекции***

[00352] Блинатумомаб был получен от Amgen. Дигитонин был приобретен у Sigma (номер по каталогу D141), и в ДМСО был приготовлен исходный раствор 100 мг/мл. Разбавленный запас 1 мг/мл был сделан в PBS. Конечная концентрация дигитонина, используемого для лизиса клеток, составляла 30 мкг/мл, если не указано иное.

[00353] ***ИФА***

[00354] Человеческий IL2, IFN γ , IL6 и TNF α измеряли в супернатанте клеточной культуры экспрессирующих CAR эффекторных клеток Jurkat-NFAT-GFP или Т-клеток, которые культивировали совместно со специфическими линиями клеток-мишеней в течение 24-96 часов с использованием коммерчески доступного ИФА. комплекты от R&D систем (Миннеаполис, Миннесота) и BD Biosciences и следуя рекомендациям производителя.

[00355] *Анализ FACS для выявления экспрессии CAR*

[00356] Мышиное анти-человеческое с - Мус APC-конъюгированное моноклональное антитело (кат. № IC3696A) было от R&D Systems (Миннеаполис, Миннесота). Биотинилированный белок L был приобретен у GeneScript (Пискатавей, Нью Джерси), восстановлен в фосфатно-солевом буфере (PBS) в концентрации 1 мг/мл и хранился при 4°C. Стрептавидин-APC (SA1005) был приобретен у ThermoFisher Scientific.

[00357] Для выявления CAR с использованием окрашивания Мус 1×10^6 клеток собирали и трижды промывали 3 мл охлажденного на льду $1 \times$ PBS, содержащего 4% промывочный буфер бычьего сывороточного альбумина (BSA). После отмывки клетки ресуспендировали в 0,1 мл ледяного отмывочного буфера, содержащего 10 мкл APC-конъюгированного антитела Мус, и инкубировали в темноте в течение 1 часа, после чего проводили две промывки ледяным отмывочным буфером.

[00358] Для выявления CAR с использованием окрашивания белком L 1×10^6 клеток собирали и трижды промывали 3 мл охлажденного на льду промывочного буфера $1 \times$ PBS, содержащего 4% бычьего сывороточного альбумина (BSA). После промывки клетки ресуспендировали в 0,1 мл ледяного промывочного буфера, содержащего 1 мкг белка L, при 4°C в течение 1 часа. Клетки трижды промывали ледяным промывочным буфером и затем инкубировали (в темноте) с 10 мкл APC-конъюгированного стрептавидина в 0,1 мл промывочного буфера в течение 30 минут с последующими двумя промывками ледяным промывочным буфером. FACS выполняли с использованием анализатора FACS Verse от BD Biosciences.

[00359] *Анализ гибели клеток*

[00360] Для измерения гибели клеток был использован новый анализ, основанный на эктопической цитозольной экспрессии Gluc, NLuc и других люцифераз, как описано в PCT/US2017/052344 «Нерадиоактивный анализ цитотоксичности». Способ включает в себя экспрессию репортера в клетках-мишенях таким образом, чтобы он преимущественно сохранялся в здоровых клетках, но либо высвобождался из мертвых и умирающих клеток, либо чья активность могла быть преимущественно измерена в мертвых и умирающих клетках. Предпочтительным репортером для этого анализа являются: 1) не секретлируемые формы люцифераз из ракообразных, таких как *Gaussia princeps*, 2) инженерные репортеры люциферазы из глубоководных креветок, такие как NanoLuc. Последовательность нескольких таких иллюстративных репортерных векторов представлена в SEQ ID NO: 3845 - SEQ ID NO: 3851. Указанные выше векторы были применены для создания ретровирусов и лентивирусов, которые, в свою очередь,

использовались для создания поликлональной популяции нескольких клеточных линий-мишеней, стабильно экспрессирующих GLuc, NLuc или TurboLuc после отбора с помощью соответствующих антибиотиков. Если не указано иное, клетки-мишени, стабильно экспрессирующие разные люциферазы, высевали в трех экземплярах в 384-луночный планшет в среде, используемой для выращивания клеток-мишеней. Клетки-мишени, которые растут в суспензии, обычно высевали в концентрации $2-3 \times 10^4$ на лунку, тогда как клетки-мишени, которые растут в виде прилипших монослоев, высевали в концентрации $1-2 \times 10^4$ на лунку. Если не указано иное, клетки-мишени культивировали совместно с генетически модифицированными T клетками (*m.e.* теми, которые экспрессируют CAR) при соотношении эффектор: мишень (E: T), варьирующемся от 1: 1 до 10: 1, в течение от 4 часов до 96 часов. В случае, когда клетки-мишени растут как прикрепленные клетки (*например*, клетки HeLa), им позволяли прикрепиться к дну лунок в течение ночи перед добавлением T-клеток. Опосредованную T клетками индукцию лизиса клеток-мишеней анализировали по увеличению активности люциферазы, измеренной с помощью устройства для считывания планшетов BioTek Synergy, путем непосредственного введения $0,5 \times$ CTZ буфера для анализа, содержащего нативный целоэнтразин (Nanolight), как описано ниже.

[00361] *Анализ CTZ*

[00362] Исходный раствор 100X нативного коэлюцентеразина (CTZ; Nanolight, кат. № 303) готовили растворением 1 мг лиофилизированного порошка CTZ в 1,1 мл 100% метанола с добавлением 30 мкл 6 N HCl, чтобы избежать окисления CTZ со временем. Для создания буфера для анализа CTZ 100-кратный исходный раствор CTZ разбавляли до концентрации 0,5X в PBS. Если не указано иное, общий объем 15 мкл буфера для анализа CTZ (как подготовлено выше) добавляли в каждую лунку 384-луночного белого планшета (Greiner, 384-луночный белый планшет кат. № 781075), содержащего клетки, экспрессирующие несекреторную форму люциферазы в объеме приблизительно 50-60 мкл среды и планшеты считывали для люминесценции с использованием планшет-ридера BioTek Synergy H4. Для 96-луночных планшетов клетки высевали в 200 мкл среды и добавляли приблизительно 50 мкл 0,5X буфера для анализа CTZ. Если не указано иное, буфер для анализа 0,5X CTZ использовали для анализа активности GLuc, TurboLuc16 и MLuc7. Буфер для анализа CTZ (разбавленный до концентрации 0,125X) также использовали для измерения активности NLuc в некоторых экспериментах. В общем, если не указано иное, объем добавленного буфера для анализа CTZ 0,5X составлял приблизительно 1/4 объема жидкости в лунке, содержащей клетки, хотя анализ также работал, когда в среду был добавлен анализ CTX 0,5X, содержащий клетки в объеме 1: 1. Активность Gluc в лунках, содержащих только среду (Med), и в лунках, в которых клетки-мишени инкубировали с T клетками, которые не были инфицированы какой-либо конструкцией CAR (T-UI), использовали в качестве контролей, где это указано.

[00363] *Анализ для выявления экспрессии антигенов на клетках-мишенях и определения антигенсвязывающей активности различных антигенсвязывающих*

фрагментов, используемых в конструировании CAR и ViTe.

[00364] Экспрессию антигенов в клетках-мишенях определяли с помощью методов биоинформатики в сочетании с иммуноокрашиванием антигенспецифическими антителами или высокочувствительным анализом обнаружения антигена, как описано в PCT/US2017/025602 и полностью включен в данное описание посредством ссылки. Этот анализ включает слияние репортерного фрагмента GLuc или NLuc с антигенсвязывающим доменом антитела, scFv, vHH или любого другого антигенсвязывающего фрагмента или любого рецептора и лиганда. Полученный слитый белок инкубируют с клетками-мишенями, экспрессирующими тестовый антиген, и связывание слитого белка определяют путем добавления коэлюэнтрина или другого подходящего субстрата репортера люциферазы.

[00365] Генерация разнообразного пула T-клеток CAR

[00366] Вышеуказанные анализы были применены для скрининга различных антигенсвязывающих модулей (*например*, scFv, vHH, рецепторов, лигандов), используемых при конструировании CAR данного изобретения, и антигенсвязывающие модули, которые, как было обнаружено, проявляли специфическую активность связывания, были отобраны для конструирования CAR. Кроме того, некоторые из scFv-фрагментов также были отобраны на основании их известной активности в литературе или в нашей лаборатории.

[00367] Возможно, что разные CAR или подгруппа CAR оптимально подходят для разных болезненных состояний в зависимости от различных факторов, включая, помимо прочего, преобладание и уровень экспрессии целевого антигена на болезнетворных и ассоциированных с болезнью клетках, бремени болезни и скорости прогрессирования заболевания. Различные CAR могут оптимально подходить даже для одного заболевания у разных пациентов в зависимости от их эффективности и профиля токсичности и состояния пациента. Данное раскрытие обеспечивает решение значительных технических и логистических препятствий для создания разнообразного адаптивного иммунного ответа.

[00368] Нормальное разнообразие TCR производится генной перестройкой. Строгие процессы позитивного и негативного отбора в тимусе гарантируют, что только T-клетки, экспрессирующие TCR $\alpha\beta$, которые ограничены распознаванием собственных пептидов/МНС в пределах диапазона низкой аффинности, могут заселять периферию. Таким образом, среда тимуса позволяет генерировать пул $\alpha\beta$ T-клеток, которые самоограничены, но не являются самореактивными.

[00369] Создание разнообразного пула клеток CAR-T из разных антигенсвязывающих доменов ограничено техническими и финансовыми препятствиями при создании и тестировании множества антигенсвязывающих доменов. Что еще более важно, так как каждый из антигенсвязывающих доменов (*например*, фрагменты vL и vH антитела) обладает потенциалом связывания других антигенов, не являющихся мишенью, и вызывает токсичность, разнообразный пул CAR, основанный только на множестве

антигенсвязывающих доменов, потенциально имеет повышенный риск токсичности. Следовательно, потенциальное разнообразие такого пула должно быть ограничено, чтобы снизить токсичность, не соответствующую мишени. Данное изобретение преодолевает эту проблему путем генерирования разнообразного пула CAR из одного или большего количества антигенсвязывающих доменов путем присоединения их к различным вариантам цепей TCR, сигнальных доменов и остовов. Разнообразие пула CAR дополнительно увеличивается за счет использования различных линкеров. Разнообразие T-ячеек, экспрессирующих пул, может быть дополнительно увеличено путем использования различных дополнительных модулей, описанных в раскрытии.

[00370] Этот разнообразный пул CAR может использоваться для обеспечения разнообразного иммунного ответа против вызывающих заболевание или связанных с болезнью клеток, экспрессирующих указанный антиген. Альтернативно, разнообразный пул CAR может быть необязательно штрих-кодирован ДНК с использованием методов, известных в данной области техники, и впоследствии использован для выбора одной или подгруппы CAR с оптимальными биологическими и клиническими характеристиками. Эти характеристики могут включать, но не ограничиваются ими, эффективность биологических анализов *in vitro* (*например*, цитотоксичность, секрецию цитокинов, аффинность связывания, экспрессию на клеточной поверхности, эффекты вне цели, пролиферацию T-клеток, экспрессию маркеров истощения и терминальной дифференцировки *и т. д.*), эффективность в анализах *in vivo* (*например*, выживаемость, уменьшение опухоли, устойчивость T-клеток, экспансия T-клеток *и т. д.*) и клинический опыт (*например*, ремиссия заболевания, частота рецидивов, токсичность *и т. д.*). CAR по данному изобретению могут использоваться отдельно или в комбинации с другими CAR и другими природными и синтетическими иммунными рецепторами, известными в данной области, для создания разнообразного пула иммунных эффекторных клеток для предотвращения и лечения различных заболеваний, вызванных или ассоциированных с клетками экспрессирующими их целевые антигены.

[00371] **Применение отбора *in vitro* и *in vivo* для отбора CAR с желаемыми свойствами.** Пул CAR, нацеленный на CD19 (SEQ ID NO: 1594-1608, 1016-1026, 1900-1910), нацелен на локус TRAC в T клетках с использованием TRAC-рРНК и методов, известных в данной области. Нацеливающий вектор также несет ДНК-штрих-коды, расположенные ниже стоп-кодона вставок CAR. T клетки могут быть получены из периферической крови. В альтернативном варианте осуществления T клетки получают из одного клона iPSC или гемопоэтических стволовых клеток с использованием методик, известных в данной области. T клетки, экспрессирующие пул CAR, совместно культивируют с клетками RAJI *in vitro* в течение от 1 до 21 дня. Аликвоты пулов клеток CAR-T собирают до культивирования с клетками-мишенями и в разные дни после совместного культивирования. Образцы подвергают секвенированию следующего поколения для определения относительной частоты различных CAR после воздействия на клетки-мишени. Биоинформатический анализ используется для определения CAR,

которые связаны с лучшим пролиферативным ответом после совместного культивирования с клетками-мишенями. По существу, аналогичный подход используется для определения CAR, которые придают более высокий пролиферативный потенциал Т клеткам *in vivo* и/или сохраняются в течение длительного времени *in vivo* и/или присутствуют с более высокой частотой при нормализации по их частоте в начальной популяции Т-клеток у выживших животных по сравнению с животными, которые умерли от опухоли. В альтернативном варианте осуществления данного изобретения, по существу, аналогичный подход используется в клинических образцах человека для идентификации CAR, которые связаны с различными свойствами и/или результатами, включая, но не ограничиваясь ими, лучшую долгосрочную выживаемость, более низкую частоту синдрома высвобождения цитокинов, более низкую нейротоксичность и/или большую долгосрочная стойкость. Такие CAR могут впоследствии использоваться, либо по отдельности, либо в различных комбинациях, для создания различных подпулов CAR, содержащих CAR, нацеленных на одни и те же или разные антигенсвязывающие домены, с различными свойствами для лечения различных заболеваний и разных пациентов. В других случаях клетки CAR-T подвергаются воздействию их линии клеток-мишеней, а затем сортируются в различные наборы на основе степени внутриклеточного IFN γ , определенной с помощью проточной цитометрии. Частота различных CAR в популяции с низким и высоким уровнем IFN γ определяется сиквенированием следующего поколения и нормируется на их частоту в контрольной популяции клеток CAR-T, *т.е.* клеток CAR-T, которые не подвергались воздействию целевой клеточной линии или подвергались воздействию клеточной линии, которая не экспрессирует мишень CAR. Из этого анализа можно определить CAR, которые связаны с различными уровнями продукции IFN γ . Подобный подход используется для скрининга и выбора CAR с любыми или комбинацией желаемых свойств или атрибутов, включая, но не ограничиваясь ими, более низкую экспрессию маркеров истощения, более низкую экспрессию маркеров терминальной дифференцировки и/или более высокую экспрессию маркеров цитотоксичности.

[00372] Применение NEMO-мутантов для обеспечения костимуляции

[00373] Известно, что у мышей NEMO-K270A (SEQ ID NO: 992) конститутивно активирован NF- κ B. Чтобы продемонстрировать способность этого мутанта обеспечивать костимуляцию Т-клеток, CD3⁺ *ve* Т-клетки культивировали в среде IV XVIVO (Lonza), с добавлением 10 нг/мл растворимого анти-CD3, 10 нг/мл растворимого анти-CD28 и 100 МЕ рекомбинантного IL2 человека. Клетки культивировали при 37°C, в 5% CO₂ в увлажненном инкубаторе и через 1 день, инфицировали лентивирусным вектором (Plenti-EGFP-бластицидин), экспрессирующим EGFP и лентивирусным вектором, экспрессирующим мышинный NEMO-K270A мутант (Plenti -mNEMO-K270A-FLAG-бластицидин и pLENTI-mNEMO-K270A-NA-Blasticidin) или мышинный NEMO-wt (pLENTI-mNEMO-FLAG-бластицидин). Последовательности mNEMO-K270A и mNEMO-wt представлены в SEQ ID NO: 992 и 991 соответственно. Приблизительно через 1 день после заражения клетки отбирали с помощью бластицина и периодически подсчитывали

количество клеток. Было продемонстрировано, что Т клетки, инфицированные лентивирусами, кодирующими мутантов мышинового NEMO-K270A (pLENTI-mNEMO-K270A-FLAG-Blasticidin и pLENTI-mNEMO-K270A-NA-Blasticidin), пролиферируют более энергично по сравнению с Т-клетками, инфицированными лентивирусами, кодирующими EGFP или мышиный NEMO-wt (pLENTI-mNEMO-FLAG-Blasticidin).

[00374] NEMO человека длиннее, чем NEMO мыши, и мутант NEMO-K277A человека (hNEMO-K277A; SEQ ID NO: 979) соответствует мутанту NEMO-K270A мыши (mNEMO-K270A). Чтобы проверить, активирует ли мутант hNEMO-K277A также NF-κB, был создан вектор экспрессии (pCDNA3), кодирующий этот мутант. Кроме того, экспрессионные конструкции, кодирующие несколько других мутантов hNEMO, в которых Lys (K) в аминокислотном остатке 277 были заменены различными аминокислотными остатками (*например*, K277Q, K277T, K277I, K277N, K277S, K277M, K277G, K277R) были получены. Различные конструкции трансфицировали в клетки 293FT вместе с конструкцией репортера NF-κB-люциферазы и репортерной конструкцией RSV-LacZ (нормализация контроля) и тестировали на их способность активировать NF-κB с использованием анализа, описанного ранее. На **Фиг. 3** продемонстрирована сильная активация NF-κB mNEMO-K270A, hNEMO-K277A и слабая активация мутантами hNEMO-K277I и hNEMO-K277G. В аналогичном эксперименте мутанты hNEMO-K277L и hNEMO-K277A-DeltaV249-K255 также продемонстрировали активацию NF-κB при трансфекции в клетки 293FT. Мутант hNEMO-K277A-DeltaV249-K255 лишен аминокислотных остатков V249-K255 человеческого NEMO, а также несет мутацию K277A. Эти результаты позволяют предположить, что конститутивно активные мутанты NEMO можно быстро генерировать и идентифицировать путем мутации остатка мышиный NEMO K270 и остатка NEMO K277 человека. Аналогичный подход можно использовать для генерации мутантов по другим остаткам NEMO, которые обладают способностью активировать NF-κB.

[00375] Была получена CD19 CAR конструкция на основе FMC63, которая совместно экспрессировалась с полноразмерным мутантом hNEMO-K277A или hNEMO-L753 (кодирующим аминокислоты 1-251) в слиянии с N-концевым доменом димеризатора FKBPx2. Конструкции трансфицировали в клетки 293FT вместе с конструкцией репортера NF-κB-люциферазы и конструкцией репортера RSV-LacZ. Приблизительно через 8 часов после трансфекции клетки не обрабатывали или обрабатывали AP20187 (100 нМ). Примерно через 72 часа клеточные лизаты готовили и анализировали на активность люциферазы NF-κB и LacZ, как описано ранее. Активность NF-κB-Luc нормализовали по активности LacZ, чтобы контролировать разницу в эффективности трансфекции. Результаты продемонстрировали, что обработка AP20187 приводила к увеличению активности NF-κB в клетках 293FT, трансфицированных конструкциями, кодирующими CAR, коэкспрессирующими как FKBPx2-hNEMO-K277A (SEQ ID NO: 1006), так и FKBPx2-hNEMO-L753 (SEQ ID NO: 1007) мутанты. Эти результаты демонстрируют способность активировать NF-κB индуцибельным образом в CAR, TCR или химерной

конструкции TCR путем совместной экспрессии полноразмерного NEMO или его делеционных мутантов в слиянии с доменом димеризатора с последующим добавлением димеризатора.

[00376] Клетки JNG инфицированы CD19-нацеленными CAR 1-го поколения на основе FMC63, коэкспрессирующими FKBPx2-hNEMO-K277A или FKBPx2-hNEMO-L753. Клетки культивируют с клетками-мишенями RAJI в отсутствие и в присутствии соединения AP20187 и, как продемонстрировано, индуцируют экспрессию EGFP, демонстрируя, что FKBPx2-hNEMO-K277A или FKBPx2-hNEMO-L753 могут коэкспрессироваться с CAR, не влияя на его активность.

[00377] В дополнение к NEMO известно, что ряд других клеточных белков конститутивно активируют NF-κB и могут использоваться в альтернативном варианте осуществления данного изобретения для обеспечения костимуляции Т-клеток с целью адаптивной клеточной терапии. Иллюстративные белки включают TCL-1A (SEQ ID NO: 1005) и конститутивно активные мутанты IKKα/IKK1 (IKK1-S176E-S180E; SEQ ID NO: 1004), IKKβ/IKK2 (IKK2-S177E-S181E; SEQ ID NO: 1002) и MYD88-L265P (SEQ ID NO: 1000). В варианте воплощения эти белки экспрессируются без домена димеризатора для обеспечения конститутивной костимуляции Т-клеток с целью адаптивной клеточной терапии. Эти белки могут экспрессироваться в Т клетках с использованием любого вектора (*например*, лентивирусных, ретровирусных, AAV или транспозонных векторов спящая красавица) или не векторной (ДНК или РНК-трансфекции) метода доставки генов, известного в данной области. Альтернативно, эти белки могут быть экспрессированы путем изменения их геномных копий с использованием методов изменения генов (*например*, Cas9, Talon, нуклеазы Zn-пальцев), известных в данной области. В иллюстративном варианте осуществления одна или большее количество геномных копий hNEMO мутированы в hNEMO-K277A с использованием гомологичной рекомбинации в Т клетках с использованием методик, известных в данной области.

[00378] Экспрессия этих костимуляторных белков может контролироваться путем экспрессии их с использованием индуцибельных промоторов, известных в данной области, таких как Tet-индуцибельный промотор или система RheoGene. В одном варианте осуществления мутант hNEMO-K277A и hNEMO-K277A-DeltaV249-K255 клонируют в векторе pSLIK-Tet-On (Gopalakrishnan et al., Clinical Cancer Res; 19 (18), 2013), и полученный вирус используют для заражения Т клетки. Продемонстрировано, что обработка Т-клеток доксициклином индуцирует экспрессию hNEMO-K277A и hNEMO-K277A-DeltaV249-K255 и активность NF-κB. Активность NF-κB измеряют с помощью AlexaFlour-конъюгированного антитела Phospho-IκBα и проточной цитометрии.

[00379] В альтернативных вариантах осуществления данного изобретения другие активирующие NF-κB белки или их сигнальные домены (*например*, IKK1, IKK2, RIP и т. д.) экспрессируются в виде слияния с доменом димеризатора, чтобы обеспечить костимуляцию для Т-клеток индуцибельным образом. Применение этих конститутивных или индуцибельных NF-κB-активирующих белков по данному изобретению не

ограничивается предоставлением костимуляции Т клеткам, поскольку они могут использоваться для обеспечения костимуляции для других иммунных клеток (*например*, НК-клеток, дендритных клеток, антиген-презентирующих клеток *и т.д.*) где известно, что активация NF-κB усиливает их функцию. Поскольку известно, что NF-κB защищает от апоптоза и способствует выживанию клеток, эти конститутивные и индуцибельные белки, активирующие NF-κB, также можно использовать в клеточной инженерии для повышения выживаемости клеток, используемых при производстве биологических продуктов. В иллюстративном варианте осуществления клетки гибридомы сконструированы для экспрессии hNEMO-K277A, hNEMO-K277A-DeltaV249-K255 (SEQ ID NO: 7769), K13, IKKα/IKK1 (IKK1-SS/EE; SEQ ID NO: 1004), IKKβ/IKK2 (IKK2-S177E-S181E; SEQ ID NO: 1002) или MYD88-L265P (SEQ ID NO: 1000) конститутивно усиливают их пролиферацию и способность расти при высокой плотности клеток.

[00380] Активаторы NF-κB для адаптивной клеточной терапии Т-клеток.

[00381] Клетки “кольца” получали из здоровых обезличенных взрослых доноров из банка крови и использовали для выделения мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) с помощью Ficoll-Нугаке градиентного центрифугирования. Т клетки выделяют с использованием микрогранул CD3 (Miltenyi), культивировали в среде XVIVO 15, дополненной CD3/CD28 Dynabeads и 50 МЕ/мл рекомбинантного IL2. В качестве альтернативы, Т клетки ресуспендировали в среде XVIVO (Lonza), добавляли 10 нг/мл CD3 - антитела, 10 нг/мл CD28 - антитела и 100 МЕ рекомбинантного человеческого IL-2.

[00382] На следующий день Т клетки инфицируются CD19-нацеленными CAR (включая CAR следующего поколения), кодирующими лентивирусные векторы в остовы pCCL3-MND3. Последовательности нуклеиновых кислот CAR представлены в SEQ ID NO: 1016-1029, 1318-1331, 1594-1604, 1900-1913, 2206-2219, 2512-2525, 2818-2831, 3124-3127, 3324-3327. Кроме того, Т клетки инфицированы конструкциями CAR, соответствующими вышеуказанным конструкциям, но в которых отсутствует модуль hNEMO-K277A. Для каждой инфекции 18 миллионов Т-клеток инфицируют 500 мкл концентрированных вирусов, кодирующих различные конструкции CAR, и 8 мкг/мл полибрана путем коинфекции при 2800 об/мин, 32°C в течение 90 минут в 6-луночных планшетах. Планшеты инкубируют при 37°C в течение 6 часов. Клетки собирают, центрифугируют для удаления вируса и полибрана, ресуспендируют в свежей культуральной среде и культивируют в течение ночи при 37°C.

[00383] На следующий день инфекцию повторяют и клетки переносят в колбы для культивирования клеток Т-75 со средой XVIVO 15, дополненной CD3/CD28 Dynabeads, 50 МЕ/мл IL2 и 5% FBS.

[00384] После 4 дней экспансии клетки CAR-Т проверяют на экспрессию CAR с использованием окрашивания белком L, связывание CD19, продукцию цитокинов (IL2, IFNγ, TNFα) и цитотоксичность (анализ Матадор).

[00385] После 10 дней размножения клетки CAR/SIR-Т используются для эксперимента *in vivo*. Для этого мышам NSG вводят 10⁶ клеток Nalm-6-Luc путем

инъекции в хвостовую вену. Через два дня инъецировали 3×10^6 клеток CAR/SIR-T. Мышей визуализируют еженедельно с помощью биолюминесцентной визуализации после введения D-люциферина и отслеживают для выживания.

[00386] Отмечено, что Т-клетки, экспрессирующие CAR первого поколения вместе с hNEMO-K277A (SEQ ID NO: 1594-1604), демонстрируют превосходную продукцию IL2, измеренную методом ИФА, при воздействии на клетки RAJI по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими CAR 2-го поколения (SEQ ID NO: 1594-1604) с костимуляторным доменом BBz. Кроме того, Т-клетки, экспрессирующие CAR первого поколения вместе с hNEMO-K277A (SEQ ID NO: 1594-1604), обнаруживают меньше признаков истощения, измеренных по пролиферации клеток, продукции цитокинов (IL2, IFN γ , TNF α), экспрессии маркеров истощения (например, PD1) и цитотоксичности (анализ цитотоксичности Матадор) при совместном культивировании с клетками RAJI в течение периода 3 недель по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими CAR 2-го поколения (SEQ ID NO: 1594-1604) с костимуляторным доменом BBz. Наконец, Т-клетки, экспрессирующие CAR первого поколения вместе с hNEMO-K277A (SEQ ID NO: 1594-1604), демонстрируют превосходную активность *in vivo* при введении мышам NSG, ксенотрансплантированным клетками NALM-6-Luc, что определяется по росту и устойчивости Т-клеток в организме. *in vivo*, снижение роста опухоли и улучшение выживаемости. Т-клетки, экспрессирующие CAR первого поколения вместе с hNEMO-K277A (Остов 2; SEQ ID NO: 1594-1604), в целом демонстрируют более слабую продукцию цитокинов (например, IL2, IFN γ и TNF α) при воздействии на клетки RAJI по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими CAR первого поколения и коэкспрессирующими vFLIP K13 (т.е. Остов 1; SEQ ID NO: 1016-1029).

[00387] Т-клетки, экспрессирующие конструкции CAR, соответствующие SEQ ID NO: 1900-1913, 2206-2219, 2512-2525, 2818-2831, 3124-3127, 3324-3327, которые экспрессируют hNEMO-K277A, демонстрируют превосходную активность *in vitro* и *in vivo* по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими сходные конструкции, но в которых отсутствует модуль hNEMO-K277A. Также продемонстрировано, что коэкспрессия модуля hNEMO-K277A улучшает производительность Т-клеток *in vitro* и *in vivo*, экспрессирующих SIR (SEQ ID NO: 9683), нацеленный на CD20. Эти результаты демонстрируют, что коэкспрессия вспомогательного модуля hNEMO-K277A усиливает активность *in vitro* (например, пролиферацию, продукцию цитокинов, задержку истощения) и *in vivo* (например, улучшенную экспансию Т-клеток и противоопухолевую активность) не только конструкции первого поколения CAR, а также TFP, Ab-TCR и SIR.

[00388] Различие также отмечено среди различных конструкций, содержащих один и тот же остов, но имеющих разные антигенсвязывающие домены. Таким образом, среди конструкций CAR первого поколения, коэкспрессирующих конструкции hNEMO-K277A (т.е. Остов 2), содержащие антигенсвязывающий домен, полученный из 4G7 (например, SEQ ID NO: 1599), huBly3 (например, SEQ ID NO: 1604) и huSJ25C1 (например, SEQ ID NO: 1605) scFV обычно слабее по сравнению с конструкциями, содержащими

антигенсвязывающий домен, полученный из scFv на основе FMC63 (например, SEQ ID NO: 1594), hu-FMC63-11 (например, SEQ ID NO: 1595), huFMC63-11-N203Q (например, SEQ ID NO: 1596), Bu12 (например, SEQ ID NO: 1597), CD19-MOR0028 (например, SEQ ID NO: 1602) и CD19-hu-mROO5 (например, SEQ ID NO: 1607). Аналогичная тенденция наблюдается в отношении активности CAR *in vitro* и *in vivo* в отношении других остовов в зависимости от природы их антигенсвязывающих доменов.

[00389] В предыдущих экспериментах модуль hNEMO-K277A экспрессировался совместно с модулем CAR в Т клетках с использованием одного вектора. Повторяется эксперимент, в котором два модуля экспрессируются с использованием двух отдельных лентивирусных векторов. SEQ ID NO конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей примерную CD20 CAR, в которой отсутствует модуль hNEMO-K277A, представлен в SEQ ID NO: 9668. Т клетки коинфицируются двумя лентивирусными векторами при множественности инфекции 5, и соотношение двух векторов (т.е. CAR: hNEMO-K277A) варьируется от 1:1 до 1:10. Т клетки размножаются и тестируются в анализах *in vitro* и *in vivo*. Продемонстрировано, что коэкспрессия hNEMO-K277A вместе с конструкцией CAR улучшает показатели клеток CAR-T *in vitro* и *in vivo*, что определяется с помощью анализов на продуцирование IL2, пролиферацию клеток, отсутствие истощения, экспансию *in vivo* и противоопухолевую активность.

[00390] В альтернативном варианте осуществления гомологичная рекомбинация с использованием методов редактирования генов, известных в данной области (например, CRISP/Cas9, TALON, нуклеазы Zn-пальцев и т. д.), используется для индукции мутации K277A в одной или обеих копиях эндогенного гена NEMO человека в Т клетки. Полученные Т клетки, несущие мутацию hNEMO-K277A, затем используются для адаптивной клеточной терапии, в том числе для экспрессии конструкций CAR, нацеленных на CD19, и конструкций TCR, нацеленных на NY-ESO-1. Продемонстрировано, что Т клетки, несущие мутации hNEMO-K277A, демонстрируют усиленную пролиферацию, продукцию цитокинов, экспансию, длительную персистенцию *in vivo* и противоопухолевую активность по сравнению с контрольными Т-клетками, в которых отсутствует мутация hNEMO-K277A.

[00391] Эксперименты, описанные в предыдущих параграфах, повторяются с использованием конструкций CAR, в которых вспомогательный модуль hNEMO-K277A заменяется вспомогательными модулями, кодирующими FKBPx2-hNEMO, FKBPx2-hNEMO-K277A (SEQ ID NO: 1006), FKBPx2-hNEMO-L753 (251) (SEQ ID NO: 1007), FKBPx2-hNEMO-L600 (200) (SEQ ID NO: 1008), IKK2-delta-SCD-FKBPv36x2 (SEQ ID NO: 7782), IKK1-delta-SCD-FKBPv36x2 (SEQ ID NO: 7781) и FKBPx2-RIP-ID (SEQ ID NO: 1009). Т клетки, экспрессирующие CAR и эти вспомогательные модули, тестируются с использованием анализов *in vitro* в отсутствие и в присутствии димеризатора AP20187 (100 нМ). Продемонстрировано, что добавление AP20187 индуцирует пролиферацию и продукцию цитокинов клетками CAR-T, экспрессирующими FKBPx2-hNEMO, FKBPx2-hNEMO-K277A (SEQ ID NO: 1006), FKBPx2-hNEMO-L753 (251) (SEQ ID NO: 1007), IKK2

-delta-SCD-FKBPv36x2 (SEQ ID NO: 7782), IKK1-delta-SCD-FKBPv36x2 (SEQ ID NO: 7781), FKBPx2-hNEMO-L600 (200) (SEQ ID NO: 1008) и FKBPx2-RIP-ID (SEQ ID NO: 1009) модули при воздействии антигена-мишени (т.е. CD19), экспрессирующего клетки RAJI. В эксперименте *in vivo* мышей NSG (n=12 на группу) ксенотрансплантировали с 2 миллионами клеток RAJI-Luc путем инъекции в хвостовую вену и спустя 3 дня вводили 5 миллионов Т-клеток, экспрессирующих CD19-CAR и коэкспрессирующих FKBPx2-hNEMO, FKBPx2-hNEMO-K277A (SEQ ID NO: 1006), FKBPx2-hNEMO-L753 (251) (SEQ ID NO: 1007), FKBPx2-hNEMO-L600 (200) (SEQ ID NO: 1008) и FKBPx2-RIP-ID (SEQ ID NO: 1009) модулей. Половине мышей в каждой группе (n=6) вводят 40 мкг AP20187 каждый день в течение 10 дней путем внутрибрюшинной инъекции, как описано ранее (Chinnery et al., J Immunol 2009; 182: 2738-2744). Продемонстрировано, что введение AP20187 способствует размножению клеток CAR-T. В альтернативном варианте эксперимент повторяют, используя конструкции, в которых оба домена FKBP несут мутацию FKBP12V36, которая связывается с проницаемым для липидов димеризующим лигандом, римидуцидом, с высокой аффинностью. Димеризация слитых белков осуществляется путем введения римидуцида. Для экспериментов *in vitro* римидуцид используется в конечной концентрации 10-100 нМ. Для исследований *in vivo* на мышях NSG римидуцид вводят еженедельно путем внутрибрюшинной (внутрибрюшинной) инъекции в дозе 5 мг/кг.

[00392] Эксперименты, описанные в предыдущих абзацах, повторяются с использованием конструкций, в которых вспомогательный модуль hNEMO-K277A заменяется вспомогательными модулями, кодирующими hNEMO-K277A-DeltaV249-K255, IKK2-S177E-S181E, IKK1-S176E-S180E, MYD88-L265P, TCL-1A и MTCP-1. Клетки CAR-T, экспрессирующие вспомогательные модули hNEMO-K277A-DeltaV249-K255, IKK2-S177E-S181E, IKK1-S176E-S180E, MYD88-L265P, демонстрируют повышенную продукцию цитокинов, пролиферацию, размножение *in vivo* и противоопухолевую активность по сравнению с клетками CAR-T, лишенными вспомогательного модуля. Продемонстрировано, что клетки CAR-T, экспрессирующие вспомогательный модуль TCL-1A и MTCP-1, имеют повышенный пролиферативный ответ.

[00393] Применение NEMO-K277A человека, NEMO-K277A-deltaV249-K255 человека, мышиногo NEMO-K270A и IKK2-S177E-S181E в вакцинации

[00394] Генерируют лентивирусные векторы, экспрессирующие NEMO-K277A человека, NEMO-K277A-deltaV249-K255 человека, мышиный NEMO-K270A и IKK2-S177E-S181E. Генерируют также лентивирусные векторы экспрессирующие аминокислотные остатки куриного флюоальбумина 242-353 и С-конец инвариантной цепи главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса II (Ii-OVA), как описано в Rowe NM et al., Molecular Therapy, 13, 2., 2006. Наконец, лентивирусные векторы генерируются для совместной экспрессии, кодирующей кассеты NEMO-K277A человека, NEMO-K277A-deltaV249-K255 человека, NEMO-K270A или IKK2-S177E-S181E мыши с кассеты, кодирующей Ii-OVA, при этом две кассеты разделены 2A последовательностью

разрезания.

[00395] *Трансдукция ДК и проточная цитометрия.* Дендритные клетки (ДК), полученные из мышинного костного мозга, получают, как описано ранее. Незрелые ДК трансдуцируют на 4-й день при MOI 20 с помощью лентивирусных векторов, как описано (Rowe NM et al., *Molecular Therapy*, 13, 2, 2006) и “кормят” каждые 4 дня свежей средой, содержащей гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (50 нг/мл; от Peprotech). На 5-й день после трансдукции ДК собирают, промывают и блокируют Fc-рецепторы перед окрашиванием поверхности маркеров созревания следующими биотин-конъюгированными Ab: анти-CD11c, анти-CD86 и анти-I-Ab (MHC класс II) (все от BD Pharmingen); анти-CD40 (от Serotec); и анти-CD80, анти-ICAM-1 и анти-Kb (MHC класса I) (все от eBioscience). Ab хомяка изотипического контроля (конъюгированное с биотином) было приобретено у BD Pharmingen. Ab затем метят реагентом стрептавидин RPE Cy-5 2o (DakoCytomation) перед проточной цитометрией. Липополисахарид (LPS) (50 нг/мл) (Sigma) добавляют к нетрансдуцированным ДК и оставляют на ночь в качестве положительного контроля для созревания. Обработка зимозаном А (10 мкг/мл) (в течение 30 мин при 37°C) используется в качестве контроля для активации ERK.

[00396] *ИФА.* Культуральные супернатанты собирают из ДК, высеванных при 5×10^5 клеток на лунку (в 1,5 мл). IL-12p70 и фактор некроза опухоли альфа (TNF- α) детектируют с помощью сэндвич-ферментного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием наборов от eBioscience в соответствии с рекомендациями производителя.

[00397] *Очистка DC из лимфатических узлов.* Мышам C57/BL6 (Harlan) вводят подкожно (п.к.) в основание хвоста 1×10^8 инфекционных единиц (ие) лентивирусного вектора. Через шесть дней собирают лимфатические узлы (парааортальные и паховые) (клетки мышей в каждой группе объединяют), инкубируют с коллагеназой CLS-4 (Worthington) и разминают для получения суспензий отдельных клеток. Fc-рецепторы блокируют перед тем, как CD11c-позитивные клетки отбирают с использованием гранул MACS (Miltenyi Biotec).

[00398] *Окрашивание пентамером.* Один миллион спленоцитов на образец инкубируют с 10 мкл конъюгированного с фикоэритрином пентамера или тетрамера SIINFEKL/Kb (Proimmune) в течение 12 минут при комнатной температуре. Затем клетки промывают и инкубируют на льду с конъюгированным с биотином анти-CD8 (Serotec) в течение 15 минут, а затем промывают и инкубируют со стрептавидин-аллофикоцианином (eBioscience) в течение 15 минут. Образцы промывают и собирают на машине BD LSR с использованием программного обеспечения Cell-Quest (BD Biosciences).

[00399] *Внутриклеточное окрашивание цитокинов.* Спленоциты инкубируют в течение ночи с пептидом OVA257-264 или без него. Раствор монензина (eBiosciences; конечная концентрация, 2 мкМ) добавляют и оставляют на 3 часа перед окрашиванием клеток на CD8. Затем клетки фиксируют и перфоризируют набором Cytofix/Cytoperm от BD Biosciences. Затем добавляют конъюгированный с аллофикоцианином анти-гамма-интерферон (анти-IFN- γ) Ab (BD Pharmingen) и оставляют на 30 минут, после чего клетки

промывают и образцы отбирают на машине BD LSR.

[00400] *Анализ ELISPOT.* Ферментные иммуноспот (ELISPOT - Enzyme-Linked ImmunoSpot) планшеты (Millipore) покрывают в течение ночи при 4°C очищенным анти-IFN- γ (BD Pharmingen). Анализы ELISPOT ex vivo проводят с серийными разведениями общих спленоцитов в трех экземплярах с пептидом OVA257-264 класса I или без него (Proimmune). Планшеты культивируют в течение ночи и визуализируют в соответствии с указаниями производителя. Точки подсчитываются с использованием счетчика AID ELISPOT и программного обеспечения.

[00401] *Тератия опухолей.* Опухолевые клетки EG7.OVA выращивают в RPMI плюс 0,4 мг/мл G418 (Invitrogen). Мышам C57BL/6 вводят 2×10^6 опухолевых клеток, путем инъекции подкожно в бок и затем вакцинируют. Животных убивают, когда у них опухоль достигает диаметра >15 мм.

[00402] Мышиные КМ-дендритные клетки (ДК) инфицируют лентивирусными векторами, кодирующими NEMO-K277A человека, NEMO-K277A-deltaV249-K255 человека, NEMO-K270A и IKK2-S177E-S181E мыши либо отдельно, либо в сочетании с Ii-OVA. Продемонстрировано, что экспрессия NEMO-K277A человека, NEMO-K277A-deltaV249-K255 человека, мышинных NEMO-K270A и IKK2-S177E-S181E приводит к ядерной транслокации p65 (RelA) в ядрах ДК на уровне, сходном с таковым в обработанных LPS ДК, но не в необработанных или ДК с контрольными векторами, в которых уровень цитоплазматического p65 выше. Увеличение NF-kB связывающей активности в ядре также обнаружено в NEMO-K277A человека, NEMO-K277A-deltaV249-K255 человека, NEMO-K270A- и IKK2-S177E-S181E мыши трансдуцированных ДК, но не влияет на активацию пути MAPK, как это определено по активности связывания ядерного AP1.

[00403] После трансдукции ДК, полученных из КМ, с помощью NEMO-K277A-человека, NEMO-K277A-deltaV249-K255 человека, NEMO-K270A- и IKK2-S177E-S181E мыши, анализируют маркеры созревания на трансдуцированных или нетрансдуцированных клетках. Уровень CD86, CD40, ICAM-1, CD80 и повышался на ДК, которые экспрессировали NEMO-K277A человека, NEMO-K277A-deltaV249-K255 человека, NEMO-K270A и IKK2-S177E-S181E мыши по сравнению с трансдуцированными ДК в группе контрольного вектора. Кроме того, продемонстрировано, что NEMO-K277A человека, NEMO-K277A-deltaV249-K255 человека, NEMO-K270A- и IKK2-S177E-S181E- мыши трансдуцированные ДК остаются CD86-позитивными в течение нескольких недель в культуре. Обнаружена повышенная секреция IL-12p70 и TNF-альфа, в культуре ДК трансдуцированных NEMO-K277A человека, NEMO-K277A-deltaV249-K255 человека, NEMO-K270A- и IKK2-S177E-S181E мыши.

[00404] После п.к. инъекции лентивирусного вектора в дренирующих лимфатических узлах обнаруживаются трансдуцированные ДК. Аналогичный процент ДК лимфатических узлов (CD11c⁺ /MHC класс II⁺) обнаруживается после подкожной

инъекции или контрольным вектором или вектором с NEMO-K277A человека, NEMO-K277A-deltaV249-K255 человека, NEMO -K270A и ИКК2-S177E-S181E. Однако наблюдается повышение уровня CD86 на ДК у животных, которым вводили NEMO-K277A человека, NEMO-K277A-deltaV249-K255 человека, NEMO-K270A и ИКК2-S177E-S181E мыши по сравнению с животными инъецированными контрольным вектором.

[00405] Исследовали способность векторов, кодирующих NEMO-K277A-2A-Ii-OB человека, NEMO-K277A-deltaV249-K255-2A-Ii-OB, NEMO-K270A-2A-Ii-OB мыши, ИКК2-S177E-S181E-2A -II-OVA и Ii-OVA индуцировать OVA-специфический ответ CD8⁺ Т-клеток у мышей после п.к. инъекции. Используется доза вектора 5×10^5 ИЕ. NEMO-K277A-2A-Ii-OVA человека, NEMO-K277A-deltaV249-K255-2A-Ii-OVA человека, NEMO-K270A-2A-Ii-OVA и ИКК2-S177E-S181E-2A-Ii-OA мыши вакцинированные мыши демонстрируют SIINFEKL/K^b пентамер-позитивные CD8⁺ Т-клетки и IFN- γ -секретирующие CD8⁺ Т-клетки по данным внутриклеточной проточной цитометрии или анализа ELISPOT.

[00406] Мышей заражают летальной дозой опухолевых клеток EG7.OVA перед инъекцией их либо трансдуцированными ДК или NEMO-K277A человека, NEMO-K277A-deltaV249-K255 человека, NEMO-K270A и ИКК2-S177E-S181E мыши векторами напрямую. Продемонстрировано, что у всех мышей развиваются опухоли. После либо инъекции трансдуцированными ДК, либо прямой инъекции лентивирусного вектора число мышей без опухолей в группе NEMO-K277A человека, NEMO-K277A-deltaV249-K255 человека, мышцах NEMO-K270A и ИКК2-S177E-S181E мыши выше, чем в контрольной группе. Эффективность векторов NEMO-K277A-2A-Ii-OVA, NEMO-K277A-deltaV249-K255-2A-Ii-OVA человека, NEMO-K270A-2A-Ii-OVA, ИКК2-S177E-S181E-2A-Ii -OVA мыши протестировали в модели защиты от паразитов (Polley R et al, Infect. Immun. 74: 773-776, 2016) с использованием *L. donovani*, экспрессирующих овальбумин.

[00407] Применение NEMO-K277A человека, NEMO-K277A-deltaV249-K255 человека, NEMO-K270A и ИКК2-S177E-S181E мыши в вакцинации

[00408] Антигенпрезентирующие клетки, собранные в результате одного лейкофереза, трансдуцируют аденовирусным вектором, кодирующим NEMO-K277A человека, NEMO-K277A-deltaV249-K255 человека, NEMO-K270A и ИКК2-S177E-S181E мыши, с последующей инкубацией с белком PA001, который содержит внеклеточный домен белка простат-специфического мембранного антигена человека. Мужчины с прогрессирующим mCRPC после ≤ 1 предшествующего режима химиотерапии регистрируются для оценки трех доз полученной вакцины (4×10^6 , $12,5 \times 10^6$ и 25×10^6 клеток), вводимых внутрикожно каждые 2-4 недели. Не существует дозозависимой токсичности. Иммунная активация, а также противоопухолевая активность наблюдаются при снижении уровня ПСА.

[00409] Конструирование и тестирование гуманизованного MPL CAR на основе scFv-фрагмента, полученного из антитела 161.

[00410] Мышиное моноклональное антитело 161 нацелено на человеческий MPL (рецептор тромбопоэтина TPO-R). Чтобы создать нацеленный на MPL CAR, но с

пониженной иммуногенностью, последовательность scFV-фрагмента, содержащая антигенсвязывающий домен антитела мыши 161, была гуманизирована. Гуманизированный фрагмент scFv 161 (SEQ ID NO: 891), обозначенный hu-161-2, был клонирован в основной цепи CAR 2-го поколения, содержащей костимуляторный домен 41BB и домен активации CD3z (SEQ ID NO: 1582). Jurkat-NFAT-EGFP (JNG) клетки были стабильно трансдуцированы лентивирусами, кодирующими гуманизованную MPL-Hu-161-2 конструкцию CAR. Родительские и CAR-экспрессирующие Jurkat впоследствии совместно культивировали с клетками HEL, и индукцию экспрессии EGFP контролировали с помощью анализа FACS через 4 часа. Совместное культивирование клеток Jurkat, экспрессирующих конструкцию CAR MPL-hu-161-2, с клетками HEL приводило к увеличению экспрессии EGFP по сравнению с клетками, которые не подвергались воздействию клеток HEL, что указывает на способность гуманизированной конструкции CAR MPL-hu-161-2 распознавать целевой антиген и активировать передачу сигналов. По существу аналогичные результаты получают, когда эксперимент повторяют с CAR первого поколения, содержащими hu-161-2 scFV и коэкспрессирующими либо vFLIP K13 (SEQ ID NO: 1286), либо мутант hNEMO-K277A (SEQ ID NO: 1878).

[00411] Конструирование и тестирование гуманизованного MPL CAR на основе scFv-фрагмента, полученного из антител 175 и 111

[00412] Мышиные моноклональные антитела 175 и 111 также связывают человеческий MPL. Поэтому, последовательность scFv-фрагментов, содержащих антигенсвязывающий домен этих антител, гуманизирована и используется для создания соответствующих конструкций CAR 2-го поколения (CAR II) (SEQ ID NO: 1583 и 1584), а также коэкспрессии остовов 1 и 2 vFLIP K13 (SEQ ID NO: 1287, 1288) и hNEMO-K277A (SEQ ID NO: 1896 и 1897). Эксперимент повторяется, как в предыдущем примере. Совместное культивирование клеток Jurkat, экспрессирующих конструкции CAR MPL-hu-175-2 и hu-111-2 CAR, с клетками HEL привело к увеличению экспрессии EGFP по сравнению с клетками, которые не подвергались воздействию клеток HEL, что указывает на способность гуманизированных конструкций CAR MPL-hu-175-2 и hu-111-2 распознавать антиген-мишень и активировать передачу сигналов.

[00413] Конструирование и тестирование CAR нацеленных на CD70

[00414] Сконструирован ряд конструкций, нацеленных на CD70 (SEQ ID NO: 9781-10086; и 7783-7789). Конструкции экспрессируются в JNG и Т-клетках и тестируются на активацию Т-клеток и цитотоксичность в отношении CD70-экспрессирующих линий клеток-мишеней RAJI и THP-1 с использованием анализов *in vitro* и *in vivo*.

[00415] Конструирование и тестирование CAR, нацеленных на CD70, PTK7, каппа-легкую цепь, Claudin18A2, комплекс Ras/HLA-A2, комплекс NY-ESO/HLA-A2, стрептэг и эпитоп CD43, экспрессируемый на клетках лейкозов.

[00416] Создают конструкции CAR, нацеленные на PTK7, легкую цепь каппа, Claudin18A2, комплекс Ras/HLA-A2, комплекс NY-ESO/HLA-A2, стрептэг и эпитоп CD43, экспрессируемый на клетках лейкозов или на остове 2-го поколения (*например*, обычный

CAR II) или остовах 1 и 2, коэкспрессирующих vFLIP K13 или hNEMO-K277A. Эксперимент повторяется, как в предыдущем примере. Совместное культивирование клеток Jurkat, экспрессирующих различные конструкции CAR, с их соответствующими клетками-мишенями привело к увеличению экспрессии EGFP по сравнению с клетками, которые не подвергались воздействию клеток-мишеней. Аналогично, совместное культивирование Т-клеток, экспрессирующих различные конструкции CAR, с их соответствующими клетками-мишенями, экспрессирующими GLuc, приводило к увеличению гибели клеток, что измерялось по увеличению активности GLuc.

[00417] TFP нацеленные на MPL

[00418] Сконструировано несколько CAR на основе TFP, нацеленных на MPL на основе hu-161-2 scFv в качестве антигенсвязывающего домена. Последовательность этих конструкций TFP CAR продемонстрирована в SEQ ID NO: 3526-3533. Клетки Jurkat-NFAT-EGFP (JNG) трансдуцируются лентивирусами, кодирующими TFP CAR, нацеленные на MPL, и отобраны пуромицином. Было продемонстрировано, что JNG клетки, экспрессирующие TFP CAR нацеленные на MPL способны экспрессировать EGFP при совместном культивировании с HEL.92.1.7 (HEL) клеток в течение 4 часов. CAR TFP, нацеленные на MPL, также экспрессируются в первичных Т клетках и тестируются на их способность индуцировать лизис клеток HEL-GLuc при совместном культивировании в течение 4 часов. Конструкции TFP CAR MPL на основе 175, 111, hu-175-2 и hu-111-2 scFv (SEQ ID NO: 10476-10483) были сконструированы аналогичным образом и протестированы с использованием JNG и первичных Т-клеток, как описано выше для hu-161-2 TFP CAR. J

[00419] TFP нацеленные на другие антигены

[00420] Затем создаются TFP CAR, нацеленные на ряд различных антигенов. Чтобы обеспечить костимуляцию, конструкции также коэкспрессируют hNEMO-K277A. Эти конструкции экспрессируются в JNG и первичных Т клетках и тестируются на их способность распознавать клетки, экспрессирующие их антиген-мишень, с использованием анализов, описанных выше. Продемонстрировано, что TFP CAR, экспрессирующие клетки JNG, индуцируют экспрессию EGFP при совместном культивировании с клеткой-мишенью, экспрессирующей их родственный антиген. Продемонстрировано, что Т клетки, экспрессирующие эти TFP CAR, нацеленные на разные антигены, индуцируют цитотоксичность клеток-мишеней, экспрессирующих соответствующий антиген, с использованием анализа цитотоксичности на основе GLuc, описанного выше. **Таблица А** демонстрирует линии клеток-мишеней, экспрессирующих различные антигены-мишени, которые используются в анализе. Дополнительные клеточные линии, экспрессирующие разные антигены-мишени, известны в данной области техники или могут быть генетически сконструированы для экспрессии желаемого антигена способами, известными в данной области. В приведенном выше примере конструкции TFP содержат вспомогательный модуль, который коэкспрессирует мутант hNEMO-K277A для обеспечения костимуляции. В альтернативном варианте

осуществления также сконструированы конструкции TFP, которые либо не имеют вспомогательного модуля для обеспечения костимуляции, либо содержат вспомогательный модуль, который обеспечивает костимуляцию посредством коэкспрессии других белков, таких как vFLIP K13. Эксперимент повторяют, как указано выше, путем экспрессии конструкций TFP в JNG и первичных Т клетках с аналогичными результатами.

[00421] **Ab-TCR нацеленный на MPL**

[00422] Сконструировано несколько Ab-TCR, нацеленных на MPL на основе мышиного 161 scFV в качестве антигенсвязывающего домена. Чтобы улучшить экспрессию Ab-TCR на основе TCR α и TCR β , в их рецепторные модули TCR вводят специфические мутации. Последовательность конструкций TCR γ /TCR δ , TCR α /TCR β дикого типа (обозначенных wt-op2) и мутантных конструкций TCR α /TCR β (обозначенных SDVP-IAH), содержащих Ab-TCR, продемонстрирована в SEQ ID NO: 959-964. Клетки Jurkat-NFAT-EGFP (JNG) трансдуцируют лентивирусами, кодирующими Ab-TCR, нацеленные на MPL (SEQ ID NO: 2091, 2397, 2703), и отбирают с помощью пуромидина. Продемонстрировано, что клетки JNG, экспрессирующие Ab-TCR, нацеленные на MPL, индуцируют экспрессию EGFP при совместном культивировании с клетками HEL в течение 4 часов, демонстрируя способность Ab-TCR, нацеленных на MPL, распознавать MPL и активировать передачу сигналов. Ab-TCR, нацеленные на MPL, также экспрессируются в первичных Т клетках и тестируются на их способность индуцировать лизис клеток HEL-GLuc при совместном культивировании в течение 4 часов. Продемонстрировано, что Т клетки, экспрессирующие Ab-TCR MPL, индуцируют лизис клеток HEL-GLuc, измеряемый по увеличению активности GLuc. Конструкции MPL Ab-TCR на основе мышиных 175 и 111 scFv (SEQ ID NO: 10492-10493) конструируют аналогичным образом и тестируют с использованием JNG и первичных Т-клеток, как описано выше для Ab-TCR на основе 161.

[00423] **Ab-TCR нацеленные на другие антигены**

[00424] Далее создаются Ab-TCR, нацеленные на ряд различных антигенов. Чтобы обеспечить костимуляцию, конструкции также коэкспрессируют hNEMO-K277A. Конструкции экспрессируются в JNG и первичных Т клетках и тестируются на их способность распознавать клетки, экспрессирующие их антиген-мишень, с использованием анализов, описанных выше. Продемонстрировано, что Ab-TCR, экспрессирующие клетки JNG, индуцируют экспрессию EGFP при совместном культивировании с клеткой-мишенью, экспрессирующей их родственный антиген. Продемонстрировано, что Т клетки, экспрессирующие эти Ab-TCR, нацеленные на разные антигены, индуцируют цитотоксичность клеток-мишеней, экспрессирующих соответствующий антиген, с использованием анализа цитотоксичности на основе GLuc, описанного выше. **Таблица А** демонстрирует линии клеток-мишеней, экспрессирующих различные антигены-мишени, которые используются в анализе. Дополнительные клеточные линии, экспрессирующие разные антигены-мишени, известны в данной

области техники или могут быть генетически сконструированы для экспрессии желаемого антигена способами, известными в данной области. В приведенном выше примере конструкции Ab-TCR содержат вспомогательный модуль, который коэкспрессирует мутант hNEMO-K277A для обеспечения костимуляции. В альтернативных вариантах осуществления также конструируются конструкции Ab-TCR, в которых либо отсутствует вспомогательный модуль для обеспечения костимуляции, либо содержится вспомогательный модуль, который обеспечивает костимуляцию посредством коэкспрессии других белков, таких как vFLIP K13. Эксперимент повторяют, как указано выше, путем экспрессии конструкций Ab-TCR в JNG и первичных Т клетках с аналогичными результатами.

[00425] Проточная цитометрия для CAR-опосредованной пролиферации трансдуцированных CD8⁺ Т-лимфоцитов в ответ на HIV-1-инфицированные клетки-мишени

[00426] Генерируется ряд CAR, нацеленных на гликопротеин оболочки HIV1, и они представлены SEQ ID NO: 8704-9349. Следующие анализы используются для проверки их активности против HIV1 *in vitro*. Активные конструкции используются отдельно или в комбинации для лечения пациентов с HIV1 и СПИДом.

[00427] HIV-1-инфицированные T2-клетки, которые имеют низкий уровень MHC класса I из-за делеции в транспортере, связанном с процессингом (TAP) (Salter, et al. (1986) EMBO J 5: 943-949) и было ранее продемонстрировано, что они являются подходящими клетки-мишени для специфичного для HIV-1 CAR (Severino, et al. (2003) Virology 306: 371-375), служили в качестве клеток-мишеней. Они инфицированы избытком репортерного вируса на основе HIV-1 NL4-3, содержащего ген для мышинового CD24 (mCD24) в локусе vpr (Ali, et al. (2003) J Virol Methods 110: 137-142) с выходом > 90% инфицированных клеток через 3 или 4 дня после заражения, как описано ранее (Bennett, et al. (2007) J Virol 81: 4973-4980; Yang, et al. (1996) J Virol 70: 5799-5806; и Yang et al. (1997) J Virol 71: 3120-3128). Их облучают непосредственно перед использованием 10 000 рад в цезиевом облучателе, а также мононуклеарные клетки периферической крови от здорового донора дозой 3000 рад (фидерные МКПК). Первичные CD8⁺ Т-лимфоциты, трансдуцированные HIV-CAR, помечают CellTrace Violet и промывают в соответствии с инструкциями производителя (ThermoFisher Scientific, Грэнд айленд, Нью-Йорк). В планшете с 48 лунками 5×10^5 меченых трансдуцированных клеток добавляют к 5×10^5 облученных инфицированных T2-клеток и 2×10^6 облученных питающих МКПК и культивируют в 1 мл R10-50 в течение пяти дней с изменением среды через три дня. Затем проводят проточную цитометрию (цитометр LSR Fortessa II, BD Biosciences) с одновременным окрашиванием на CD8 человека (PerCP-anti-human CD8, кат. № 30130, Biolegend, Сан-Диего, Калифорния) и анализом пролиферации с использованием программного обеспечения FlowJo (FlowJo, Эшланд, Орегон). Продemonстрировано, что Т клетки, трансдуцированные HIV-CAR, пролиферируют при воздействии HIV-1-инфицированных T2-клеток.

[00428] Анализы подавления вируса

[00429] Способность трансдуцированных HIV1-CAR CD8+ Т-лимфоцитов и их размноженных и обогащенных клонов подавлять репликацию HIV-1 тестируют, как описано ранее (Yang et al. (1997) PNAS USA 94: 11478-11483; и Yang et al. et al. (1997) J Virol 71: 3120-3128). Протестированные штаммы HIV-1 получены из программы NIH “Эталоны и реагенты СПИД”, в том числе 94US_3393 IN (кат. № 11250), 90JJS873 (кат. № 11251), 96TH_NP1538 (кат. № 11252), 00TZ_A246 (кат. № 11256). Вкратце, T1-клетки, трансдуцированные человеческим CCR5, инфицируют с множеством 0,1 инфекционных доз для культуры ткани на клетку и совместно культивируют в 96-луночной планшете с CAR1-трансдуцированными клетками HIV1 в соотношении 5×10^4 к $1,25 \times 10^4$ клеток соответственно в 200 мкл R1 0-50 или без эффекторных клеток в качестве контроля. Подтверждено, что >90% эффекторных клеток трансдуцировано. Все условия повторяются в трех экземплярах, и репликация вируса контролируется с помощью количественного ИФА p24 (XpressBio, Фредерик, Мэрилэнд). Продемонстрировано, что воздействие CAR1 на HIV1-клетки приводит к подавлению HIV1, что измеряется с помощью ИФА p24.

[00430] Эффекторные клетки, экспрессирующие HIV1-CAR, также тестируют на антивирусную активность против инфицированных CD4+ клеток. Клетки T2-CCR5 инфицируют панелью штаммов HIV-1, включая первичные R5-тропические изоляты, и культивируют в отсутствие или в присутствии эффекторных клеток, трансдуцированных HIV1-CAR. Репликацию вируса оценивают путем измерения антигена p24 между 7 и 10 днями культивирования. Подавление репликации рассчитывается как разность логических единиц p24 между культурами без эффекторных клеток по сравнению с эффекторными клетками, которая затем нормализуется как отношение к общей репликации без эффекторных клеток.

[00431] Анализы уничтожения с высвобождением хрома уничтожения клеток-мишеней, инфицированных HIV-1, при помощи CAR

[00432] Клетки T2-GLuc, инфицированные штаммом HIV-1 NL4-3, как указано выше, используют в качестве клеток-мишеней для первичных CD8+ Т-лимфоцитов, трансдуцированных HIV1-CAR, в анализе Матадор или с использованием стандартных анализов высвобождения ^{51}Cr , как описано ранее (Bennett et al. (2007) J Virol 81: 4973-4980; Yang et al. (1996) J. Virol 70: 5799-5806; Bennett et al. (2010) Aids 24: 2619-2628). Вкратце, инфицированные и контрольные неинфицированные T2-клетки метят ^{51}Cr в течение 1 часа и инкубируют с эффекторными CD8+ Т-лимфоцитами или без них в течение 4 часов при различных соотношениях клеток в 96-луночной планшете с U-образным дном. Супернатанты затем собирают для измерения внеклеточного ^{51}Cr путем микро204 сцинтилляционного подсчета в 96-луночных планшетах. Спонтанное высвобождение измеряют на клетках-мишенях без эффекторных клеток, а максимальное высвобождение измеряют на клетках-мишенях, лизированных 2,5% Тритоном X-100. Удельный лизис рассчитывается как: (экспериментально выделенный хром -

самопроизвольный выброс) ÷ (максимальный выброс - самопроизвольный выброс).

[00433] **Биспецифические антитела, нацеленные на MPL**

[00434] Биспецифические антитела, такие как биспецифические ловушки Т-клеток (BiTE) и перенацеливание с помощью двойной аффинности (DART), можно использовать для перенацеливания Т-клеток на клетки-мишени, экспрессирующие определенный антиген.

[00435] Сконструирована нацеленная на MPL биспецифическая ловушка Т-клеток на основе 161 scFV в качестве антигенсвязывающего домена. Последовательность этой биспецифической конструкции продемонстрирована в SEQ ID NO: 3736. Биспецифические конструкции содержат линкер GGGSG-Streptagx2-Tag (SEQ ID NO: 287), но могут использоваться альтернативные линкеры (*например*, SGGGS).

[00436] Биспецифичную конструкцию трансфицировали в клетки 293FT и супернатант, содержащий слитый белок, собирали через 48-96 часов. Было продемонстрировано, что клетки HEL-GLuc, культивируемые с Т-клетками в присутствии биспецифического слитого белка MPL-161, подвергаются лизису клеток, как определено анализом GLuc, по сравнению с клетками, культивируемыми только с биспецифическим слитым белком или только Т-клетками.

[00437] Затем конструируют биспецифические антитела, кодирующие конструкции на основе 175, 111, hu-161-2, hu-175-2 и hu-111 scFv, и они обнаруживают активность в анализе цитотоксичности HEL-GLuc. Наконец, биспецифические антитела, нацеленные на ряд других антигенов, включая PTK7, DLL3, TROP2, CD179a, CD179b, CD23, LAMP1, CDH1, CDH17, CD32, CDH19, HIV1-gp120, гликопротеин оболочки *и т. д.*, аналогично сконструированы и, как установлено, имеют активность при совместном культивировании с клеточными линиями-мишенями, экспрессирующими их родственный антиген.

[00438] **Фиг. 4.** Активность биспецифические ловушки Т-клеток, нацеленной на MPL и использующей домен нацеливания 161-scFv. HEL-Plenti-hGluc и Т клетку предварительно инкубировали отдельно со следующими супернатантами при 4°C в течение 2 ч Plenti-161-StreptagII-CD3-Мус-His-P02 (042517-P02-SC) и только со средой. После инкубации клетки совместно культивировали в 96-луночной планшете с U-образным дном в соотношении Е:Т 1: 1 или 5: 1 в течение 4 часов при 37°C. 50 мкл клеток+супер/луноку переносили в 384-луночный планшет в трех экземплярах. Анализ hGluc проводили с использованием 15 мкл буфера для анализа CTZ (1: 100).

[00439] **Экспрессия и активность TFP в клетках Jurkat, лишенных экспрессии TCR α и TCR β .**

[00440] Клетки Jurkat-NFAT-GFP (JNG) (Т-клеточная лимфома) инфицировали лентивирусными векторами, экспрессирующими нРНК, нацеленные на константные цепи TCR α и TCR β 1/2, и коэкспрессирующими Streptococcus Pyogenes Cas9. Иллюстративные последовательности-мишени для нРНК для цепей TCR α приведены в SEQ ID NO: 7754 и 7755. Иллюстративные последовательности-мишени для нРНК для цепей TCR β 1/2 приведены в SEQ ID NO: 7756-7758. В альтернативном варианте осуществления TCR α и

TCR β 1/ β 2 локусы константной цепи ориентированы с помощью нРНК и TALON, как описано в Knipping F et al, *Molecular Therapy: Methods & Clinical Development*, Vol 4, 2017. Клетки JNG, в которых отсутствует экспрессия цепей TCR α или TCR β 1/ β 2, очищают путем сортировки клеток с использованием антител, направленных против комплекса TCR/CD3. Lentивирусные векторы, экспрессирующие TFP, нацеленные против человеческого MPL (SEQ ID NO: 2184, 2490, 2796) под промотором EF1 α , используют для инфицирования родительских клеток JNG (контроль) и тех, у которых отсутствует экспрессия цепей TCR α или TCR β 1/ β 2. Экспрессию TFP в клетках определяют путем иммуноокрашивания окрашиванием белком L и окрашивания гибридным белком MPL-ECD-GGSG-NLuc-AcV5 (SEQ ID NO: 4923). Родительские клетки JNG демонстрируют устойчивую экспрессию TFP на клеточной поверхности, тогда как клетки JNG, не имеющие цепей TCR α или TCR β 1/ β 2, демонстрируют плохую или отсутствующую экспрессию TFP. Различные популяции клеток JNG подвергаются воздействию клеток-мишеней HEL.92.1.7 в течение 24 часов и исследуются на предмет увеличения экспрессии GFP, стимулируемой NFAT-промотором, и продукции IL2. Родительские клетки JNG, экспрессирующие MPL-специфичные TFP, демонстрируют заметное увеличение флуоресценции GFP и секреции IL2 при совместном культивировании с клетками HEL.92.1.7. Напротив, MPL-специфичные TFP-экспрессирующие клетки JNG с отсутствующими цепями TCR α или TCR β 1/ β 2 демонстрируют слабую индукцию GFP и секрецию IL2. По существу сходные результаты получают, когда эксперимент повторяют с родительскими JNG и TCR α - или TCR β 1/ β 2-дефицитными клетками при экспрессии TFP, нацеленных на CD19 (SEQ ID NO: 1913, 2219, 2525), CD20 (SEQ ID NO: 1945, 2251, 2557) и CD22 (SEQ ID NO: 1950, 2256, 2562) и при совместном культивировании с клетками-мишенями RAJI и Nalm6.

[00441] Следующие lentивирусные векторы, экспрессирующие кодон-оптимизированную константную цепь TCR α (IgSP-; SEQ ID NO: 1010) или константную цепь TCR β (IgSP-[hTRBC-opt2]; SEQ ID NO: 1011) под промотором EF1 α , используют для инфицирования различных популяций клеток JNG. Экспрессия константной цепи TCR α в MPL-специфичных TFP-экспрессирующих клетках JNG, в которых цепь TCR α была нарушена опосредованным нРНК нокаутом генов, приводит к повышенной экспрессии TFP на клеточной поверхности и индукции экспрессии GFP и секреции IL2 при совместной культуре с клетками-мишенями HEL.92.1.7. Аналогичным образом, экспрессия константной цепи TCR β в MPL-специфичных экспрессирующих TFP клетках JNG, в которых цепь TCR β 1/ β 2 была нарушена с помощью нРНК-обусловленного нокаута гена, приводит к повышенной экспрессии TFP на клеточной поверхности и индукции экспрессии GFP и IL2 секреции при совместном культивировании с клетками-мишенями HEL.92.1.7

[00442] **Экспрессия и активность Ab-TCR и cTCR/SIR в клетках Jurkat, в которых отсутствует экспрессия TCR α и TCR β .**

[00443] Вышеупомянутый эксперимент повторяется за исключением того, что

вместо TFP, нацеленных на CD19, используются экспрессионные кассеты, кодирующие Ab-TCR и SIR, нацеленные на CD19 человека. Ab-TCR, нацеленные на CD19, представлены SEQ ID NO: 3124. сTCR/SIR, нацеленные на CD19, представлены SEQ ID NO: 3878-3880. Продемонстрировано, что экспрессия Ab-TCR, сTCR и SIR в клетках JNG, в которых отсутствует экспрессия TCR α или TCR β 1/ β 2, приводит к увеличению экспрессии и активности по сравнению с их экспрессией в родительских клетках JNG.

[00444] Аллогенные и готовые к употреблению Т клетки, экспрессирующие CAR, TFP и Ab-TCR раскрытия

[00445] Аллогенные или готовые клетки CAR-T получают путем уменьшения или устранения экспрессии эндогенной цепи TCR α и/или TCR β с использованием TALON, CRISP/Cas9 или других нуклеаз.

[00446] MPL-специфичные TFP-кассеты (SEQ ID NO: 3527, 3529, 3531) клонируют в нацеливающих конструкциях, предназначенных для нацеливания в геномный локус TRAC и содержащих правое и левое плечи гомологии, полученные из геномных последовательностей TRAC. Последовательность полиаденилирования вставляется ниже стоп-кодона TFP. Схема нацеливания конструкции и стратегии ориентации продемонстрирована на **Фиг. 5А**. Последовательности нацеливающих конструкций представлены в SEQ ID NO: 3858, 7773 и 7776. Нацеливающий конструкции клонируют в лентивирусный вектор с дефектом интеграции (IDLV) и вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV). Конструкции направлены на локус TRAC в очищенных человеческих Т клетках с использованием CRISP/Cas9 (**Фиг. 5А**), как описано в методиках, известных в данной области техники, и с использованием последовательности нРНК TRAC (SEQ ID NO: 7751): 5'С*А*G*GGUUCUGGAUAUGUGUGUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU* U* U* U-3'. Звездочка (*) обозначает 2'-О-метил 3'-фосфоротиоат. Иллюстративные методики для доставки нацеливающих конструкторов в локус TRAC с использованием IDLV и AAV описаны в Knipping F et al, Molecular Therapy: Methods & Clinical Development, Vol 4, 2017 и Eyquem J et al Nature, 543(7643):113-117, 2017 соответственно. Параллельно очищенные человеческие Т клетки также трансдуцируют с использованием традиционного подхода с лентивирусными векторами, кодирующими соответствующие конструкции TFP (SEQ ID NO: 2184, 2490, 2796) под промотором EF1 α , для генерации клеток, экспрессирующих различные TFP. Экспрессию TCR $\alpha\beta$ и TFP в Т клетках определяют путем иммуноокрашивания антителами TCR/CD3 и окрашивания белком L соответственно. Экспрессию TFP на Т клетках также исследуют путем окрашивания слитым белком MPL-ECD-GGSG-NLuc-AcV5 (SEQ ID NO: 4923). Различные популяции Т-клеток подвергаются воздействию клеток-мишеней HEL.92.1.7-GLuc и сравниваются с использованием *in vitro* и *in vivo* анализов активации клеток, пролиферации, продукции цитокинов (*например*, IL2), лизиса клеток-мишеней, старения, истощения, *in vivo* размножения, *in vivo* стойкости и *in vivo* противоопухолевой активности. TFP демонстрируют нарушенную экспрессию на

поверхности Т-клеток и пониженную или отсутствующую активность (*например*, активацию Т-клеток, пролиферацию, продукцию цитокинов и цитотоксичность *и т. д.*) в Т клетках, когда их экспрессия направлена в локус TRAC по сравнению с тем, когда они экспрессируются с использованием лентивирусных векторов. Затем проверяется, можно ли использовать экспрессию константной цепи TCR α (цепь TRAC) для восстановления экспрессии и передачи сигналов TFP и активности в Т клетках, в которых эндогенный локус TRAC генома был нарушен каскадом экспрессии TFP. Для этой цели конструируют нацеливающие конструкции, которые коэкспрессируют TFP с помощью вспомогательного модуля, кодирующего константную цепь TCR α с аминоконцевым сигнальным пептидом (IgSP) (**Фиг. 5В**). Вспомогательный модуль отделен от последовательности кодирования TFP с помощью линкера Furine-SGSG-P2A. Нуклеотидная последовательность иллюстративных нацеливающих конструкций, коэкспрессирующих константную цепь TCR α с конструкциями TFP, нацеленными на MPL, продемонстрирована в SEQ ID NO: 3859, 7774 и 7777). Нуклеотидная последовательность константной цепи TCR α в этих конструкциях кодон-оптимизирована и отличается от эндогенной константной цепи TCR α своей нуклеотидной последовательностью. В альтернативном варианте осуществления цепь TRAC кодон-оптимизирована и несет аминокислотные замены, которые, как известно, усиливают экспрессию константной цепи TCR α человека. Нуклеотидная последовательность иллюстративных экзогенных цепей TRAC, которую можно использовать для реэкспрессии комплекса TCR/CD3 в Т клетках, в которых экспрессия эндогенного гена TCR α подавлена или устранена путем нацеливания, продемонстрирована в SEQ ID NO: 3886 до 3894. Экзогенный TRAC может экспрессироваться в Т клетках либо сам по себе (SEQ ID NO: 1010), либо он может совместно экспрессироваться с каскадами экспрессии TFP с использованием одного вектора.

[00447] Специфичные для MPL конструкции TFP (SEQ ID NO: 3858, 7773 и 7776) и конструкции TFP-TRAC (SEQ ID NO: 3859, 7774 и 7777) клонируются в вектор IDLV и AAV и по существу направлены на локус TRAC, как описано ранее.

[00448] Клетки, экспрессирующие конструкции, подвергают воздействию клеточ-мишеней HEL.92.1.7-GLuc и тестируют в функциональных анализах, как описано выше. Т клетки, в которых конструкции TFP-TRAC направлены на локус TRAC, демонстрируют лучшую экспрессию TFP на клеточной поверхности по сравнению с Т-клетками, в которых только конструкции TFP (*т.е.* без коэкспрессии экзогенной цепи TRAC) направлены на локус TRAC. Кроме того, Т клетки, в которых TFP-Trac конструкции направлены на TRAC локус демонстрируют больше пролиферации, активации, продукции цитокинов (*например*, IL2 и TNF- альфа), цитотоксичности, *in vivo* размножения, *in vivo* противоопухолевой активности против клеток - мишеней по сравнению с Т клетками, в которых конструкции njkmrj TFP (*т.е.* без коэкспрессии экзогенной цепи TRAC) направлены на локус TRAC.

[00449] Экспрессия и активность TFP также восстанавливаются в Т-клетках, в

которых эндогенный локус TRAC был разрушен путем конструирования нацеливающей кассеты, так что за TFP-кассетой в рамке считывания следует разрезаемый линкер 2A, сигнальный пептид (*например*, сигнальный пептид CD8) или сигнальный пептид IgH) и первый экзон цепи TCR α (TRAC) (Фиг.5С). Нуклеотидная последовательность иллюстративных нацеливающих конструкций продемонстрирована в SEQ ID NO: 3860, 7775 и 7778. В этом варианте осуществления белок TRAC продуцируется эндогенной цепью TRAC, экспрессия клеточной поверхности которой облегчается сигнальным пептидом, содержащимся в нацеливающей кассете.

[00450] Аллореактивность TFP-TRAC-экспрессирующих Т-клеток, у которых отсутствует экспрессия нативной цепи TCR α , но в которых экспрессия и активность TFP на клеточной поверхности снижается благодаря экспрессии константной цепи TCR α , тестируется с использованием реакции культуры смешанных лимфоцитов с использованием облученных Т-клеток, полученных от аллогенного донора. Количество Т-клеток, экспрессирующих TFP-TRAC, в которых отсутствует экспрессия нативного TCR α , заметно снижается до отсутствия аллореактивности, измеряемой по пролиферативному ответу, по сравнению с количеством Т-клеток, в которых TFP экспрессируются с использованием лентивирусных векторов. Способность TFP-TRAC-экспрессирующих Т-клеток человека, у которых отсутствует экспрессия нативного TCR α , индуцировать болезнь «трансплантат *против* хозяина» (GVHD), исследуют путем введения 5 миллионов TFP-TRAC-экспрессирующих TCR α -дефицитных Т-клеток на животное животным с иммунодефицитом NSG. (Jackson Lab). Животные находятся под наблюдением более 90 дней. Количество Т-клеток человека, в которых TFP-TRAC-кассеты направлены на локус TRAC, заметно уменьшается до отсутствия болезни «трансплантат *против* хозяина» (GVHD) при инфузии иммунодефицитным мышам NSG (Jackson Lab), в то время как GVHD наблюдается у животных, которым вводят Т-клетки в какие TFP экспрессируются с использованием лентивирусных векторов. Способность TFP-TRAC-экспрессирующих TCR α -дефицитных Т-клеток человека индуцировать болезнь «трансплантат *против* хозяина» (GVHD) также исследуют путем введения 1 миллиона клеток на килограмм аллогенным реципиентам человека, которые получили лимфодеплирующую химиотерапию. Аллогенные Т-клетки, в которых кассеты TFP-TRAC направлены на локус TRAC, демонстрируют заметно сниженную частоту и тяжесть заболевания «трансплантат *против* хозяина» (GVHD) при приеме аллогенным реципиентом.

[00451] По существу аналогичные результаты получают, когда эксперимент повторяют с Т-клетками, в которых TFP направлены на локус TRBC. Последовательность-мишень для РНК, нацеленной на TRBC, продемонстрирована в SEQ ID NO: 7756-7758. Эти рРНК используются в сочетании со *Streptococcus Pyogenes* Cas9 с использованием методов, известных в данной области. Продемонстрировано, что направление кассет экспрессии TFP в геномный локус TRBC приводит к нарушению активности MPL-специфических TFP. Однако активность TFP восстанавливается путем совместной экспрессии экзогенной константной цепи TCR β (TRBC). Нуклеотидная

последовательность иллюстративных экзогенных цепей TRBC, которую можно использовать для восстановления сигнальной функции комплекса TCR/CD3, продемонстрирована в SEQ ID NO: 3899-3910. Экзогенный TRBC может экспрессироваться в Т клетках либо сам по себе (SEQ ID NO: 1011), либо он может совместно экспрессироваться с кассетами экспрессии TFP из одного вектора. Нуклеотидная последовательность иллюстративных конструкций, коэкспрессирующих цепь TRBC с конструкциями TFP, нацеленными на MPL, продемонстрирована в SEQ ID NO: 3537, 3539 и 3541. Эти экспрессирующие конструкции TFP могут быть клонированы в подходящих векторах, нацеленных на TRBC, с использованием методик, известных в данной области. В альтернативном варианте осуществления экспрессия TRBC может быть восстановлена в Т клетках, в которых эндогенный локус TRBC нарушен путем конструирования нацеливающей кассеты, так что за кассетой TFP в рамке считывания следует разрезаемый линкер 2A, сигнальный пептид (*например*, сигнальный пептид CD8 или сигнальный пептид IgH) и первый экзон цепи TCR β (TRBC).

[00452] Нацеливание конструкций Ab-TCR на локус TRAC

[00453] Две Ab-TCR-конструкции, нацеленные на CD19 на основе scFv FMC63, генерируются в лентивирусном векторе (SEQ ID NO: 3837), управляемом промотором EF1 α . Нуклеотидные последовательности этих конструкций, CD8SP-FMC63-vL- -F-P2A-SP-FMC63-vH- и CD8SP-FMC63-vL - -F-P2A-SP-FMC63-vH- представлены нуклеотидными последовательностями, кодирующими компонент Ab-TCR последовательностей SEQ ID NO: 3124 и 3324. Первичные человеческие Т клетки инфицируются соответствующими лентивирусными супернатантами и анализируются на экспрессию Ab-TCR на клеточной поверхности с использованием супернатанта FLAG-CD19-ECD-GGSG-NLuc-AcV5 (SEQ ID NO: 1014) и на цитотоксичность в отношении RAJI-GLuc клетки. Т клетки, экспрессирующие Ab-TCR, демонстрируют умеренную экспрессию и активность. Экспрессия Ab-TCR направляется в локус TRAC по существу, как описано Eucem J et al. (Nature, 543 (7643): 113-117, 2017) с использованием генных таргетных конструкций (см. **Фиг. 6**) представленных в SEQ ID NO: 3861-3864. Нацеливающая конструкция содержит акцептор сплайсинга (SA), за которым следует кодирующая последовательность F2A, кассета Ab-TCR, фланкированная последовательностями, гомологичными локусу TRAC (LHA и RHA, левое и правое плечо гомологии). В кассетах А и В (SEQ ID NO: 3861-3862) за нуклеотидной последовательностью, кодирующей экспрессионные кассеты Ab-TCR, следует стоп-кодон, последовательности полиА, экзон 1 TRAC и последовательность, гомологичная локусу TRAC (RHA: правое плечо гомологии). В кассете С за нуклеотидной последовательностью, кодирующей экспрессионную кассету Ab-TCR, следует стоп-кодон, экзон 1 TRAC и последовательность, гомологичная локусу TRAC (RHA: правое плечо гомологии), но без последовательности поли А, так что транскрипт несет на 3'-конце ген TRAC и его последовательность полиаденилирования. В кассете D в кассете Ab-TCR отсутствует собственный модуль TCR α , и он распространяется только до области IgG1-CH1, которая

слита в рамке с 3' половиной первого экзона TRAC. Таким образом, в этой конструкции модуль TCR α кодируется геномным локусом TRAC, содержащим часть экзона 1, а также весь экзон 2 и экзон 3. Кассета E напоминает кассету D, за исключением того, что RHA в нацеливающей конструкции несет мутации (SDVP), которые могут усиливать экспрессию TRAC. Т клетки, в которых кассеты Ab-TCR нацелены на локус TRAC, демонстрируют однородную и физиологическую экспрессию, а также долговременную персистенцию и активность трансгена, как определено с использованием анализов *in vivo* и *in vitro*, по сравнению с кассетами Ab-TCR, экспрессированными с использованием лентивирусных векторов. Экспрессирующие Ab-TCR Т клетки очищают окрашиванием PE-протеином L с последующей сортировкой проточной цитометрией. Аллореактивность Ab-TCR-экспрессирующих Т-клеток тестируют с использованием реакции культивирования смешанных лимфоцитов с использованием облученных Т-клеток, полученных от аллогенного донора. Т клетки, в которых Ab-TCR направлены на локус TRAC, демонстрируют сниженную или отсутствие аллореактивности, измеряемой по пролиферативному ответу, по сравнению с Т-клетками, в которых Ab-TCR экспрессируется с использованием лентивирусных векторов. Способность экспрессирующих Ab-TCR Т-клеток человека индуцировать болезнь «трансплантат *против* хозяина» (GVHD) исследуют путем введения 5 миллионов экспрессирующих Ab-TCR Т-клеток на животное мышам с иммунодефицитом NSG (Jackson Lab). Животные находятся под наблюдением более 90 дней. Т клетки человека, в которых кассеты Ab-TCR направлены на локус TRAC, заметно уменьшаются до отсутствия болезни трансплантат *против* хозяина (GVHD) при инфузии иммунодефицитным мышам NSG (Jackson Lab), в то время как GVHD наблюдается у животных, которым дают Т-клетки, у которых Ab-TCR экспрессируются с использованием лентивирусных векторов. Способность экспрессирующих Ab-TCR Т-клеток человека индуцировать болезнь «трансплантат *против* хозяина» (GVHD) также исследуют путем введения Т-клеток, экспрессирующих Ab-TCR (1 миллион клеток на килограмм), аллогенным реципиентам человека. Аллогенные Т клетки, в которых Ab-TCR-кассеты направлены на локус TRAC, демонстрируют заметно сниженную частоту и тяжесть реакции «трансплантат *против* хозяина» (GVHD) при приеме аллогенных реципиентов. По существу аналогичные результаты получены с использованием Т-клеток, в которых Ab-TCR экспрессируются путем нацеливания экспрессионных кассет в локус TRBC.

[00454] Нацеливание химерных конструкций TCR или синтетических иммунных рецепторов (SIR) в локус TRAC

[00455] Три конструкции сTCR (или SIR), нацеленные на CD19 на основе scFv FMC63, генерируются в лентивирусном векторе (SEQ ID NO: 3837), управляемом промотором EF1 α . Нуклеотидные последовательности этих конструкций представлены SEQ ID NO: 3878, 3879 и 3880 соответственно. Все они имеют одинаковые vL и vH области. Хотя SEQ ID NO: 3880 имеет нуклеотидную последовательность дикого типа из константных цепей TCR α и TCR β , SEQ ID NO: 3878 и 3879 имеют кодон-

оптимизированные последовательности. SEQ ID NO: 3878 дополнительно содержит несколько аминокислотных замен для усиления экспрессии и спаривания оснований константных цепей TCR α и TCR β . Первичные человеческие Т клетки инфицируют соответствующими лентивирусными супернатантами и анализируют на экспрессию SIR на клеточной поверхности с использованием супернатанта FLAG-CD19-ECD-GGSG-NLuc-AcV5 (SEQ ID NO: 1014) и на цитотоксичность в отношении клеток RAJI-GLuc. Не обнаружено, что конструкция сTCR/SIR с SEQ ID NO: 3880 хорошо экспрессирует или индуцирует лизис клеток-мишеней. сTCR/SIR также направлены на локус TRAC, по существу, как описано Eyuem J et al. (Nature, 543 (7643): 113-117, 2017) с использованием иллюстративных конструкций генного нацеливания (см. **Фиг. 7**), представленных SEQ ID NO : С 3865 до 3868 и 3873. Нацеливающая конструкция содержит акцептор сплайсинга (SA), за которым следует кодирующая последовательность F2A, кассета Ab-TCR, фланкированная последовательностями, гомологичными локусу TRAC (LHA и RHA, левая и правое плечо гомологии). В кассетах А и В (SEQ ID NO: 3865, 3866 и 3873) за нуклеотидной последовательностью, кодирующей кассеты экспрессии SIR, следуют стоп-кодон, последовательности polyA, экзон 1 TRAC и последовательность, гомологичная локусу TRAC (RHA: правое плечо гомологии). В кассете Е за нуклеотидной последовательностью, кодирующей кассету экспрессии SIR, следует стоп-кодон, экзон 1 TRAC и последовательность, гомологичная локусу TRAC (RHA: правое плечо гомологии), но без промежуточной последовательности поли А, так что транскрипт несет в себе его 3'-конец гена TRAC и его последовательность полиаденилирования. В кассете D в кассете SIR отсутствует собственный модуль TCR α , и она распространяется только до области FMC63-vH, которая слита в рамке считывания с первым экзоном TRAC, присутствующим в целевой конструкции. Таким образом, в этой конструкции модуль TCR α кодируется геномным локусом TRAC, содержащим часть экзона 1 и целые экзоны 2 и 3. Кассета F напоминает кассету Е, за исключением того, что RHA в нацеливающей конструкции несет мутации (CSDVP) в экзонах 1 и 2 TRAC, которые могут усиливать экспрессию TRAC. Т клетки, в которых кассеты сTCR/SIR направлены на локус TRAC (SEQ ID NO: 3873), демонстрируют однородную и физиологическую экспрессию и долговременную персистенцию и активность трансгена, как определено с использованием анализов *in vivo* и *in vitro*, по сравнению с сTCR/SIR-кассеты, экспрессируемые с использованием лентивирусных векторов. Другие сTCR (SEQ ID NO: 3865-3868) также демонстрируют однородную экспрессию и активность при направлении в локус TRAC. Экспрессирующие сTCR и SIR Т-клетки очищают окрашиванием конъюгированным с FITC антителом CD3 и PE-белком L с последующей сортировкой проточной цитометрией. Аллореактивность сTCR- и SIR-экспрессирующих Т-клеток тестируют с использованием реакции культуры смешанных лимфоцитов с использованием облученных Т-клеток, полученных от аллогенного донора. Т клетки, в которых сTCR/SIR направлены на локус TRAC, заметно снижаются до отсутствия аллореактивности, измеряемой по пролиферативному ответу, по сравнению с Т клетками, в которых сTCR/SIR экспрессируются с использованием

лентивирусных векторов. Способность человеческих Т-клеток, экспрессирующих сTCR/SIR, индуцировать болезнь «трансплантат *против* хозяина» (GVHD) исследуют путем введения 5 миллионов Т-клеток, экспрессирующих сTCR/SIR, на животное животным с иммунодефицитом NSG (Jackson Lab). Животные находятся под наблюдением более 90 дней. Т клетки человека, в которых кассеты сTCR/SIR направлены на локус TRAC, демонстрируют заметно уменьшенную или отсутствующую болезнь «трансплантат *против* хозяина» (GVHD) при инфузии иммунодефицитным мышам NSG (Jackson Lab), в то время как GVHD наблюдается у животных, которым дают Т-клетки, у которых сTCR/SIR экспрессируются с использованием лентивирусных векторов. Способность человеческих Т-клеток, экспрессирующих сTCR и SIR, индуцировать болезнь «трансплантат *против* хозяина» (GVHD) также исследуют путем введения Т-клеток, экспрессирующих сTCR/SIR (1 миллион клеток на килограмм), аллогенным реципиентам человека, которые получили лимфодеплирующую химиотерапию. Аллогенные Т клетки, в которых кассеты сTCR/SIR направлены на локус TRAC, демонстрируют заметно сниженную частоту и тяжесть реакции «трансплантат *против* хозяина» (GVHD) при введении аллогенным реципиентам. По существу аналогичные результаты получены с использованием Т-клеток, в которых экспрессируются сTCR и SIR путем нацеливания кассет экспрессии в локус TRBC.

[00456] **Направление конструкций TCR или сTCR/SIR в локус TRAC**

[00457] Конструкция TCR и конструкция сTCR (или SIR), нацеленные на комплекс NY-ESO-1/HLA-A2, генерируются в лентивирусном векторе (SEQ ID NO: 3837) и основаны на TCR NYESO-1G4 и имитирующем TCR антителе NYESO-35-15. Нуклеотидные последовательности этих конструкций представлены SEQ ID NO: 3883 и 3882 соответственно. Две конструкции также нацелены на локус TRAC с использованием нацеливающих конструкций, представленных SEQ ID NO: 3874-3877. Конструкция целевой конструкции продемонстрирована на **Фиг. 8**. Т клетки, в которых TCR или сTCR NY-ESO-1 направлены на локус TRAC, демонстрируют равномерную экспрессию трансгена, хорошее распознавание клеток-мишеней, экспрессирующих комплекс NY-ESO-1/HLA-A2, и одинаково хорошо или лучше, чем Т клетки, в которых указанные выше конструкции экспрессируются с помощью лентивирусного опосредованного переноса гена с использованием анализов *in vivo*. Т клетки человека, в которых TCR или сTCR NY-ESO-1 направлены на локус TRAC, также проявляют пониженную аллореактивность в реакции со смешанными лимфоцитами и сниженную GVHD на модели ксенотрансплантата мышей NSG по сравнению с Т-клетками, в которых NY-ESO-1 или сTCR экспрессируются с использованием лентивирусного опосредованного переноса гена.

[00458] **Направление одноцепочечной конструкции сTCR/SIR в локус TRAC**

[00459] Одноцепочечные сTCR/SIR, в которых FMC63-scFv присоединен к кодон-оптимизированной константной цепи TCRA или кодон-оптимизированной плюс константной цепи мураинизированного TCRA (SEQ ID NO: 3881), экспрессируются в Т клетках с использованием лентивирусного вектора и демонстрируют плохую экспрессию

и активность. Эти же конструкции направлены на локус TRAC с использованием нацеливающих конструкций, продемонстрированных на **Фиг. 9** и представленных SEQ ID NO: 3869-3872. Т-клетки, в которых одноцепочечные сTCR/SIR направлены на локус TRAC, демонстрируют однородную экспрессию и активность сTCR при анализе с использованием анализов, описанных ранее. Кроме того, Т-клетки, в которых одноцепочечные сTCR/SIR направлены на локус TRAC, демонстрируют снижение частоты аллореактивности с использованием MLR и снижение частоты GVHD с использованием модели ксенотрансплантата мышей NSG по сравнению с Т-клетками, в которых NY-ESO-1 или сTCR экспрессируются с использованием лентивирус опосредованного переноса генов.

[00460] В приведенных выше примерах CAR/TFP/Ab-TCR/TCR/сTCR направлены на локус TRAC. По существу аналогичная процедура может быть использована для направления CAR/TFP/Ab-TCR/TCR/сTCR или вспомогательного модуля в локусы TCBC, CD3ε, CD3δ, CD3γ и CD3ζ с использованием способов, известных в данной области техники.

[00461] Более короткий промотор EF1α сохраняет сильную промоторную активность в Т клетках и подходит для адаптивной клеточной терапии.

[00462] Применение сильных вирусных промоторов в способах адаптивной клеточной терапии сопряжено с риском активации последующих онкогенов и развития рака. Таким образом, промотор человеческого фактора элонгации 1α (EF1α) часто используют в применениях адаптивной клеточной терапии, поскольку он обеспечивает сильную экспрессию и имеет человеческое происхождение. Однако ограничением промотора EF1α является его относительно большой размер. Хотя был описан промотор mini-EF1α, он намного слабее по сравнению с промотором EF1α. Чтобы определить, позволит ли внутренняя делеция в промоторе EF1α укорачивать его длину при сохранении его силы промотора, из промотора EF1α был удален фрагмент SacII. Нуклеотидная последовательность полученного промотора EF1α-D-SacII представлена в SEQ ID NO: 3842. Лентивирусные векторы, кодирующие CD19-нацеленный CAR FMC63-BBz, были сконструированы в векторах с промотором EF1α дикого типа (SEQ ID NO: 3840) или промотором EF1α-D-SacII (SEQ ID NO: 3839). Векторы также коэкспрессировали ген устойчивости к EGFP и бластидину через 2A линкеры. Лентивирусы были созданы в клетках 293FT и использовались для заражения клеток JNG. Инфицированные клетки отбирали с помощью бластидина и затем тестировали на их способность индуцировать экспрессию EGFP при совместном культивировании с CD19+ ve RAJI-клетками. Почти эквивалентная индукция экспрессии EGFP наблюдалась в клетках JNG, трансдуцированных любой лентивирусной конструкцией. Кроме того, почти эквивалентная экспрессия CAR FMC63-BBz наблюдалась на поверхности клеток JNG, трансдуцированных любой конструкцией, что было определено путем связывания со слитым белком CD19-ECD-GGS-NLuc. Эти результаты демонстрируют, что промотор EF1α-D-SacII можно использовать для применения в адаптивной клеточной терапии.

Результаты также демонстрируют, что промотор EF1 α -D-SacII не более склонен к сайленсингу, чем промотор EF1 α дикого типа, и его можно использовать для длительной экспрессии трансгена.

[00463] Применение водорастворимой соли дазатиниба для контроля синдрома высвобождения цитокинов и неврологических осложнений, наблюдаемых при адаптивной клеточной терапии

[00464] Дазатиниб является плохо растворимым в воде лекарственным средством, а коммерческий дазатиниб является моногидратом и, как сообщается, имеет растворимость 8 мкг/мл при 24°C. Поскольку пациенты с SRB и неврологическими осложнениями испытывают трудности при приеме пероральной формы дазатиниба, желательна водорастворимая форма дазатиниба. Водорастворимые соли дазатиниба описаны в WO2015107545 A1. Инъецируемые композиции, содержащие растворимые соли моногидрата метансульфоната дазатиниба, могут быть получены в соответствии со способом WO2015107545 A1 и применены для лечения пациентов с CRS и неврологическими осложнениями, связанными с введением клеток CAR-T и блинатумомаба. Дозу моногидрата метансульфоната дазатиниба можно титровать до достижения эффективной концентрации в плазме. В иллюстративном варианте осуществления концентрация дазатиниба в плазме поддерживается выше, чем 10 нМ, 20 нМ, 50 нМ, 100 нМ, 200 нМ или 300 нМ. В другом иллюстративном варианте осуществления концентрация дазатиниба в плазме поддерживается выше, чем 5 нг/мл, 15 нг/мл, 25 нг/мл, 50 нг/мл или 75 нг/мл. Наконец, моногидрат метасульффоната дазатиниба, растворенный в физиологическом растворе, также можно использовать для интратекального введения пациентам с неврологическими осложнениями, вызванными клетками CAR-T и блинатумомабом. В иллюстративном варианте осуществления интратекальную дозу метасульффоната дазатиниба регулируют для достижения концентрации CSF выше 10 нМ, 20 нМ, 50 нМ, 100 нМ, 200 нМ или 300 нМ. В иллюстративном варианте осуществления интратекальную дозу метасульффоната дазатиниба регулируют для достижения концентрации CSF выше, чем более 5 нг/мл, 15 нг/мл, 25 нг/мл, 50 нг/мл или 75 нг/мл.

[00465] Применение аутологичных Т-клеток, экспрессирующих обычные CAR и остовы 1-72, нацеленных на множественные антигены, для адаптивной клеточной терапии

[00466] Пациенты со многими различными заболеваниями, включая инфекционные заболевания (*например*, HIV1, EBV, CMV, HTLV1 и т. д.), дегенеративные заболевания (*например*, болезнь Альцгеймера), аллергические заболевания (*например*, хроническую идиопатическую крапивницу) и многие виды рака, будут включены в IRB одобренное клиническое испытание I фазы иммунотерапии адаптивно перенесенными аутологичными клетками CAR-T, коэкспрессирующими NEMO-K277A (остов 2), нацеленных на различные вызывающие заболевание или связанные с заболеванием антигены. CAR для различных заболеваний будет выбран на основе известной экспрессии их целевого

антигена в вызывающих заболевание или ассоциированных с заболеванием клетках. Где это возможно, экспрессия мишени CAR на вызывающих заболевание или ассоциированных с заболеванием клетках будет подтверждена связыванием с антигенсвязывающим доменом слитого белка GGS-NLuc, в котором антигенсвязывающий домен CAR слит с несекреторной формой NLuc белок через гибкий линкер. Альтернативно, иммуногистохимия или проточная цитометрия с использованием коммерчески доступных антител будут использоваться для подтверждения экспрессии целевого антигена CAR на вызывающих заболевание или ассоциированных с заболеванием клетках. Т клетки будут собираться у субъектов с использованием лейкофереза, трансдуцироваться соответствующими лентивирусными векторами и размножаться *ex vivo* с использованием гранул CD3/CD28 в закрытой системе. После того как полученные в результате клеточные продукты будут подвергнуты проверке качества (включая тесты на стерильность и специфическую цитотоксичность опухоли), они будут подвергнуты криоконсервации. Клеточные продукты CAR-T будут вводиться субъектам, как описано в предыдущем примере. Клинические и лабораторные корреляционные исследования могут быть выполнены по усмотрению врача. По существу, аналогичный подход используется для тестирования CAR в других остовах, описанных в данном раскрытии.

[00467] Применение аллогенных Т-клеток, экспрессирующих обычные CAR и остовы 1-72, нацеленных на множественные антигены, для адаптивной клеточной терапии

[00468] В исследование будут включены пациенты со многими различными заболеваниями, включая инфекционные заболевания (*например*, HIV1, EBV, CMV, HTLV1 и т. д.), дегенеративные заболевания (*например*, болезнь Альцгеймера), аллергические заболевания (*например*, хроническую идиопатическую крапивницу) и многие виды рака в одобренной IRB фазе I клинического испытания иммунотерапии адаптивно перенесенными аллогенными клетками CAR-T, нацеленными на различные вызывающие заболевание или связанные с заболеванием антигены. CAR для различных заболеваний будет выбран на основе известной экспрессии их целевого антигена в вызывающих заболевание или ассоциированных с заболеванием клетках. Где это возможно, экспрессия мишени CAR на вызывающих заболевание или ассоциированных с заболеванием клетках будет подтверждена связыванием с антигенсвязывающим доменом слитого белка GGS-NLuc, в котором антигенсвязывающий домен CAR слит с несекреторной формой NLuc белок через гибкий линкер. Альтернативно, иммуногистохимия или проточная цитометрия с использованием коммерчески доступных антител будут использоваться для подтверждения экспрессии целевого антигена CAR на вызывающих заболевание или ассоциированных с заболеванием клетках. Т клетки будут собраны у здорового донора с помощью лейкофереза. Экспрессирующая кассета CAR (SEQ ID NO: 1900 - SEQ ID NO: 2205) клонируется в нацеливающем векторе, и модуль CAR направляется на локус TRAC в Т клетках, по существу, как описано (Eyuquem J et al,

Nature 543 (7643): 113-117). Т клетки, лишенные экспрессии CD3 на поверхности выбираются с помощью иммуномагнитной очистки, а затем размножаются с помощью ex vivo CD3/CD28 гранул в замкнутой системе. После того как полученные в результате клеточные продукты будут подвергнуты проверке качества (включая тесты на стерильность и специфическую цитотоксичность опухоли), они будут подвергнуты криоконсервации. Клеточные продукты CAR-T будут вводить субъектам, как описано в предыдущем примере. Клинические и лабораторные корреляционные исследования могут быть выполнены по усмотрению врача. По существу, аналогичный подход используется для тестирования CAR в других остовах, включая CAR, которые коэкспрессируют TCR α -константную цепь (TRAC), в которой отсутствует домен V α , описанные в данном раскрытии.

[00469] Печеночная артериальная инфузия CAR-T клеток

[00470] В дополнение к внутривенной инфузии, Т-клетки, экспрессирующие обычные CAR и остовы 1-72, описанные в этом изобретении, могут быть введены внутриартериально, чтобы обеспечить высокую концентрацию клеток CAR-T в локальной области или органе, связанном с заболеванием. В следующем примере этот подход используется в случае пациента с метастазами в печень от рака желудочно-кишечного тракта, который экспрессирует альфа-рецептор фолата (FR1). По существу, аналогичный подход может быть использован для внутриартериальной инфузии Т-клеток, экспрессирующих обычные CAR и скелеты 1-72, нацеленных на другие опухолевые антигены.

[00471] Картографическая ангиограмма будет выполнена через правую общую бедренную артерию в начале исследования. Гастродуоденальная и правая желудочные артерии, в дополнение к другим потенциальным источникам внепеченочной перфузии, будут эмболизированы с помощью микрокатушек. Такая же процедура доступа к артериям будет проводиться для введения Т-клеток, экспрессирующих конструкцию CD8SP-FR1-huMov19- (vL-vH) -Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-T2A-PAC (SEQ ID NO: 1727). Т клетки будут собраны у пациента в день 0 и будут инфицированы лентивирусом, кодирующим конструкцию CD8SP-FR1-huMov19- (vL-vH) -Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-T2A-PAC и размножены, как описано в предыдущих примерах. Клетки CAR-T будут вводиться с повышением дозы на 14-й день (10^7 клеток CAR-T), 28-й день (10^8 клеток CAR-T) и 44-й день (10^9 клеток CAR-T). Клетки CAR-T будут вводиться вручную с помощью 60 мл шприца со скоростью <2 куб. см/сек. Общий объем инфузии составит примерно 100 куб. см. Ангиография с калиброванной контрастностью будет выполняться после первой инфузии в 50 см^3 и по завершении инфузии CAR-T для подтверждения сохраненного артериального кровотока. Настои будут доставлены в соответствующую печеночную артерию, когда это возможно. У некоторых пациентов может иметь место aberrantная анатомия печеночной артерии, при которой правая или левая печеночная артерия не возникает из правильной печеночной артерии. В таких случаях доза клеток CAR-T будет разделена на основе расчетов объема в долях. В таких случаях отдельные

дозы будут доставляться отдельно в правую и левую печеночные артерии, чтобы обеспечить пропорциональную доставку CAR-T в обе доли печени.

[00472] Внутривнутрибрюшинное введение клеток CAR-T

[00473] Клетки CAR-T также можно вводить внутривнутрибрюшинно, по существу, как описано в Konegu M et al. (Journal of Translational Medicine; 2015; 13: 102). В следующем примере этот подход используется у пациентов с поражением брюшины раком яичников, который экспрессирует альфа-рецептор фолата (FR1). По существу, аналогичный подход можно использовать для внутривнутрибрюшинной инфузии клеток CAR-T, нацеленных на другие опухолевые антигены, описанные в данном раскрытии.

[00474] Пациентам с рецидивирующим высокосортным серозным раком яичника будет предложено информированное согласие на скрининг для проверки их рака на экспрессию FR1. После того как экспрессия FR1 подтверждена иммуногистохимией, у пациентов будет отобран продукт лейкофереза, из периферической крови. Излишки тромбоцитов и эритроцитов будут удалены из продукта лейкофереза, и продукт будет заморожен. На этапе лечения исследования продукт лейкофереза будет размораживаться и промываться. Затем CD3+ T клетки будут выделены из оттаявшего продукта лейкофереза путем магнитного разделения с использованием гранул CD3/CD28. Активированные T клетки будут лентивирусно трансдуцироваться конструкцией CD8SP-FR1-huMov19- (vL-vH) -Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-T2A-PAC и далее размножаться с использованием протокола размножения гранул CD3/CD28.

[00475] Пациенты с рецидивирующей высокосортной серозной карциномой яичника, первичной брюшины или фаллопиевой трубы, у которых выявлено экспрессирование антигена FR1, подтвержденное иммуногистохимическим (ИГХ) анализом архивированной (залитой парафином) или только что подвергшейся биопсии опухоли, потенциально будут иметь право на исследование.

[00476] Дозирование Фазы I с повышением дозы будет использоваться в испытании. Когортам из 3-6 пациентов будут вводить увеличивающиеся дозы модифицированных T-клеток для установления максимально переносимой дозы (МПД). Будет четыре запланированных уровня дозы: 3×10^5 , 1×10^6 , 3×10^6 и 1×10^7 клеток CAR-T/кг. К группам I и II будут относиться 3×10^5 клеток CAR-T/кг, но пациенты в группе II также получают лимфодеплирующий циклофосфамид. Когорты II-V будут получать возрастающие дозы модифицированных T-клеток после предварительной обработки циклофосфамидом. Лимфодеструктивный циклофосфамид, дозированный в дозе 750 мг/м^2 будет вводиться за 2-4 дня до начальной инфузии T-клеток. Будет использована стандартная схема повышения дозы 3+3.

[00477] IP-катетер будет размещен до инфузии T-клеток. Пациенты будут госпитализированы в стационарное отделение больницы до первой инфузии T-клеток CAR и будут оставаться в больнице в течение не менее 3 дней после второй инфузии T-клеток CAR. Первая группа пациентов, подлежащих лечению, и первый пациент, проходящий лечение в каждой последующей группе, будут помещены в отделение

интенсивной терапии (ОИТ); последующие пациенты могут быть приняты в стационарную медицинскую онкологическую службу (в зависимости от клинического заключения лечащего врача).

[00478] Пациенты получают одну дозу лимфодеплетирующего циклофосфида ($750 \text{ мг/м}^2 \text{ IV}$), химиотерапии 2 до 4 дней до начала лечения с CAR-модифицированных Т клетками. Трансдуцированные Т клетки будут проверены на качество, количество, чистоту, жизнеспособность и стерильность перед инфузией. Все пациенты получают 50% генетически модифицированной дозы Т-клеток внутривенно. Пациенты будут тщательно контролироваться на токсичность. Через один-три дня оставшуюся дозу Т-клеток вводят в виде IP-инфузии. По меньшей мере 3 пациента будут проходить лечение на уровне дозы 1, при этом на каждом уровне дозы будет начисляться не более 2 пациентов в месяц. Все пациенты, которых лечили в предыдущей когорте, будут наблюдаться в течение как минимум 4 недель со дня первоначальной инфузии Т-клеток до того, как произойдет эскалация в следующую когорту. Образцы крови будут взяты у всех пациентов до и после лечения для оценки токсичности, терапевтического эффекта и выживаемости генетически модифицированных Т-клеток.

[00479] Применение клеток CAR-T для внутриопухолевой инъекции

[00480] Клетки CAR-T также можно вводить внутрь опухоли, по существу, как описано в Brown CE, et al, Clin Cancer Res. 2015 September 15; 21(18): 4062-4072. В следующем примере этот подход будет использоваться в случае пациентов с рецидивирующей глиобластомой (GBM), которая экспрессирует IL13Ra2. По существу, аналогичный подход может быть использован для внутриопухолевой инъекции Т-клеток, экспрессирующих обычные CAR или обычные CAR, экспрессирующие дополнительные модули (остовы 1-72), нацеленные на другие опухолевые антигены.

[00481] Будет проведено пилотное исследование безопасности и технико-экономического обоснования для тестирования CD8SP-IL13Ra2-Hu108- (vL-vH) -Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-T2A-PAC (SEQ ID NO: 1769), экспрессирующих Т клетки в рецидивирующем GBM. Все участвующие пациенты должны будут дать письменное информированное согласие. Клинический протокол будет утвержден Институциональным комитетом по обзору Университета Южной Калифорнии и проведен в соответствии с заявлением о новых лекарственных средствах для исследования, а также зарегистрирован на ClinicalTrials.gov. Подходящими пациентами будут взрослые (18-70 лет) с рецидивирующей или рефрактерной унифокальной супратенториальной глиомой III или IV степени, опухоли которой не обнаруживают связи с путями желудочков/CSF и поддаются резекции. Участие в этом испытании не зависит от статуса опухолевого антигена IL13Ra2 (или IL13Ra2). Пациенты будут зачислены после первоначального диагноза глиомы высокой степени (класс III или IV ВОЗ), после чего они будут подвергнуты лейкаферезу для сбора мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК). Эти клетки будут применены для конструирования Т-клеток для экспрессии конструкции CD8SP-IL13Ra2-Hu108- (vL-vH) -Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-T2A-PAC,

содержащей ген устойчивости к пуромицину (PAC), после заражения соответствующий лентивирусный вектор, как описано в предыдущих примерах. Альтернативно, клетки CAR-T могут быть получены после инфицирования ретровирусным вектором или с использованием транспозона спящая красавица или путем трансфекции мРНК IVT. Впоследствии проверенные на высвобождение терапевтические клетки CAR-T будут криоконсервированы и сохранены для последующего использования. Во время первого рецидива опухоли участник исследования подвергнется резекции опухоли вместе с размещением резервуара/катетера Рикхэма. Одновременно с этим терапевтические клетки CAR-T будут оттаивать, повторно размножаться *in vitro* с использованием протокола быстрого размножения на основе гранул CD3/CD28. После выздоровления после операции и МРТ после базовой линии, клетки CAR-T будут вводиться непосредственно в полость резекции через постоянный катетер, по существу, как описано (Brown CE, et al, Clin Cancer Res. 2015 21(18): 4062-4072). Клетки будут вручную вводиться в резервуар Рикхэма с использованием иглы-бабочки 21 размера для доставки объема 2 мл в течение 5-10 минут с последующим промыванием 2 мл нормальным солевым раствором без консервантов в течение 5 минут. В протоколе лечения будет указан график повышения дозы внутри пациента с целью 12 доз CAR T-клеток, вводимых внутривенно в течение 5-недельного периода, состоящего из еженедельных циклов лечения. Во время циклов 1, 2, 4 и 5 инфузии T-клеток будут выполняться в дни 1, 3 и 5 циклической недели, а неделя 3 будет циклом отдыха. В целях безопасности в 1-м цикле будет использоваться стратегия повышения дозы в стационаре, при которой дозы T-клеток CAR составляют 10^7 , 5×10^7 и 10^8 клеток на инфузию, вводимые в дни 1, 3 и 5 соответственно, и за этим последуют 9 дополнительных инфузий T-клеток CAR из 10^8 клеток в течение 4 недель. Визуализация для оценки реакции будет выполняться в течение цикла отдыха 3 недели и после 5 недели. Руководства, представленные в Общих критериях токсичности NCI (NCI Common Toxicity Criteria) версии 2.0 (<https://ctep.ifo.nih.gov/>), будут использоваться для мониторинга сообщений о токсичности и нежелательных явлениях.

[00482] Применение клеток CAR-T для очистки ex-vivo костного мозга или препарата стволовых клеток периферической крови перед трансплантацией

[00483] CAR T-клетки могут быть применены для очистки костного мозга или препарата стволовых клеток периферической крови перед трансплантацией стволовых клеток. В следующем примере T-клетки, экспрессирующие CD8SP-CS1-HuLuc64- (vL-vH) -Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-T2A-PAC (SEQ ID NO: 1699), будут применены для очистки стволовых клеток костного мозга или периферической крови, полученных от пациента с множественной миеломой до трансплантации аутологичных стволовых клеток (или костного мозга).

[00484] Пациент будет подвергаться лейкоферезу для сбора мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК). T-клетки будут очищены с использованием гранул CD3. Эти клетки будут применены для конструирования T-клеток для экспрессии CD8SP-CS1-HuLuc64- (vL-vH) -Myc-z-P2A- hNEMO-K277A-T2A-PAC CAR после заражения

соответствующим лентивирусным вектором, как описано в предыдущих Примерах. Затем проверенные терапевтические клетки CAR-T будут криоконсервированы и хранятся для последующего использования или для использования в свежем виде. Клетки костного мозга и продукты клеток-предшественников периферической крови будут собраны у пациента с множественной миеломой в соответствии со стандартными процедурами. Для мобилизации стволовых клеток периферической крови пациенты будут получать циклофосфамид, 3 мг/м² с последующим G-CSF, 10 мкг/кг подкожно каждый день, начиная с 24 ч после циклофосфамида, пока не завершится фerez. Стволовые клетки периферической крови собираются после того, как количество CD34+ -клеток периферической крови составит 15 клеток/мкл. Целью сбора будет обработать три объема крови в день, пока после обработки не будет достигнут минимум 2,0×10⁶ CD34+ клеток/кг. Продукты из костного мозга и стволовых клеток периферической крови будут необязательно лишены эритроцитов и/или обогащены на клетки, экспрессирующие CD34, с использованием системы CliniMACS Prodigy[®] от Miltenyi Biotec и следуя рекомендациям производителя. Продукты будут использоваться для очистки ex-vivo в свежем или криоконсервированном виде. Для очистки продукты костного мозга или стволовых клеток периферической крови будут совместно культивировать с размороженными клетками CAR-T с соотношением эффектор/мишень в диапазоне от 5: 1 до 30: 1 в течение от 4 до 24 часов в среде XVIVO (Lonza), с добавлением 100% IU рекомбинантный человеческий IL2. Клетки будут культивировать при 37°C в инкубаторе с 5% увлажнением CO₂. В конце периода совместного культивирования отбирают аликвоту клеток для тестирования на стерильность и качество (включая измерение CFU-GM и проточную цитометрию для CD34 и CD138-положительных клеток). Оставшийся образец будет вводиться внутривенно пациенту, который ранее получил миелоабляционную химиотерапию (*например*, высокая доза мелфалана в двух разделенных дозах по 70 мг/м² для общей дозы 140 мг/м²).

[00485] Применение биспецифических Т-клеток

[00486] Белки, кодируемые биспецифическими ловушками Т-клеток, экспрессируются в клетках HeLa с использованием конструкций, имеющих SEQ ID NO, перечисленных в **Таблице 13**. Белки очищают с использованием метки сродства с металлом или колонок StrepTag II с использованием стандартных методов очистки белка. Очищенные белки тестируются в I фазе клинических испытаний. Пациентов отбирают на основании экспрессии целевых антигенов биспецифических антител с использованием различных анализов, известных в данной области. **Биспецифические** антитела вводят путем 24-часовой инфузии. Руководства, представленные в Общих критериях токсичности 2.0 NCI ([http -\[s: //\] ctep.ifo.nih.gov/](http://ctep.ifo.nih.gov/)), используются для мониторинга сообщений о токсичности и неблагоприятных событиях.

[00487] Применение комбинаций CAR

[00488] Пациентам с мезотелиомой и глиобластомами вводят Т клетки, инфицированные лентивирусами, кодирующими следующую комбинацию CAR,

нацеленных на мезотелин (экспрессируемых на мезотеломе), IL13Ra2 (экспрессируемых на глиобластомах) и гемопоэтических маркеров (CD19, CD20, CD22, BCMA). Т клетки представляют собой либо цепи TCR дикого типа, либо имеют цепь TCR α , нокаутированную с помощью подхода CRISP/Cas9. Наблюдается, что совместная экспрессия в тех же Т-клетках с цепями TCR дикого типа CAR, нацеленного на мезотелин, с CAR, нацеленного на CD19, CD20, CD22 или BCMA, приводит к увеличению экспансии Т-клеток *in vivo* по сравнению с экспрессией одного мезотелина. По существу аналогичные результаты получены с CAR, нацеленным на глиобластома. Однако в Т клетках, которые являются дефектными в цепях TCR, коэкспрессия CAR на основе TFP, нацеленных на CD20 (SEQ ID NO: 9660), не может индуцировать экспансию *in vivo* при одновременной коэкспрессии SIR (SEQ ID NO: 9668) или Ab-TCR (CAR на основе SEQ ID NO: 9676) успешно индуцирует экспансию Т-клеток.

[00489] Таблица 15 Влияние комбинации CAR на экспансию Т-клеток *in vivo*

Заболевание	TCR статус Т клеток	Целевой антиген 1-го CAR	SEQ ID 1-го CAR	Целевой антиген 2-го CAR	SEQ ID 2-го CAR	Размножение Т-клеток
Мезотелиома	Дикий тип	Мезотелин	1505	Нет		Слабое
Мезотелиома	Дикий тип	Мезотелин	1505	CD19	1016	Хорошее
Мезотелиома	Дикий тип	Мезотелин	1505	CD19	1607	Хорошее
Мезотелиома	Дикий тип	Мезотелин	1505	CD20	1631	Хорошее
Мезотелиома	Дикий тип	Мезотелин	1505	CD22	1644	Хорошее
Мезотелиома	Дикий тип	Мезотелин	1505	BCMA	1624	Хорошее
Глиобластома	Дикий тип	IL13Ra2	1493	Нет		Слабое
Глиобластома	Дикий тип	IL13Ra2	1493	CD19	1016	Хорошее
Глиобластома	Дикий тип	IL13Ra2	2075	CD19	1607	Хорошее
Глиобластома	Дикий тип	IL13Ra2	2381	CD20	1631	Хорошее
Глиобластома	Дикий тип	IL13Ra2	2687	CD22	1644	Хорошее
Глиобластома	Дикий тип	IL13Ra2	2687	BCMA	1624	Хорошее
Глиобластома	TCR-альфа-ve	IL13Ra2	2075	CD20	9660	Слабое

Глиобластома	TCR-альфа- ve	IL13Ra2	2381	CD20	9660	Слабое
Глиобластома	TCR-альфа- ve	IL13Ra2	2687	CD20	9660	Слабое
Глиобластома	TCR-альфа- ve	IL13Ra2	1493	Нет		Слабое
Глиобластома	TCR-альфа- ve	IL13Ra2	1493	CD20	9668	Хорошее
Глиобластома	TCR-альфа- ve	IL13Ra2	2075	CD20	9676	Хорошее
Глиобластома	TCR-альфа- ve	IL13Ra2	2381	CD20	9668	Хорошее
Глиобластома	TCR-альфа- ve	IL13Ra2	2687	BCMA	9362	Хорошее
Глиобластома	TCR-альфа- ve	IL13Ra2	2687	BCMA	9362	Хорошее

[00490] Различные способы и методики, описанные выше, предоставляют несколько способов осуществления данного применения. Конечно, следует понимать, что не обязательно все описанные цели или преимущества могут быть достигнуты в соответствии с любым конкретным вариантом осуществления, описанным в данном документе. Таким образом, например, специалисты в данной области техники поймут, что способы могут быть выполнены способом, который достигает или оптимизирует одно преимущество или группу преимуществ, как описано в данном документе, без необходимости достижения других целей или преимуществ, как указано или предложено в данном документе. Различные альтернативы упомянуты в данном документе. Следует понимать, что некоторые предпочтительные варианты осуществления конкретно включают в себя один, другой или большее количество признаков, в то время как другие конкретно исключают один, другой или большее количество признаков, в то время как третьи смягчают конкретный признак путем включения одного, другого или нескольких полезных признаков.

[00491] Кроме того, специалист в данной области распознает применимость различных признаков из разных вариантов осуществления. Аналогично, различные элементы, признаки и этапы, обсужденные выше, а также другие известные эквиваленты для каждого такого элемента, признака или этапа, могут использоваться в различных комбинациях специалистом в данной области техники для выполнения способов в соответствии с описанными принципами в данном описании. Среди различных элементов, признаков и этапов некоторые будут специально включены, а другие специально исключены в различных вариантах осуществления.

[00492] Ряд вариантов осуществления был изложен выше для иллюстрации данного раскрытия. Далее в формуле изобретения изложено, что заявители считают своим изобретением.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммунная клетка (immune cell) или популяция указанной иммунной клетки, экспрессирующая (i) по меньшей мере один не встречающийся в природе иммунный рецептор и (ii) по меньшей мере один не встречающийся в природе агент, который селективно активирует сигнальный путь NF- κ B.

2. Иммунная клетка или популяция указанной иммунной клетки по п. 1, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один не встречающийся в природе иммунный рецептор содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий домен и по меньшей мере один трансмембранный домен.

3. Иммунная клетка или популяция указанной иммунной клетки по п. 1, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один не встречающийся в природе иммунный рецептор способен к рекрутингу по меньшей мере одного сигнального модуля ассоциированного с TCR.

4. Иммунная клетка или популяция указанной иммунной клетки по п. 1, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один не встречающийся в природе иммунный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR - chimeric antigen receptor) или рекомбинантный TCR.

5. Иммунная клетка или популяция указанной иммунной клетки по п. 2, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один антиген-связывающий домен по меньшей мере, одного не встречающегося в природе иммунного рецептора связывается с антигеном, выбранным из группы, состоящей из CD5; CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS1 (также называется как подгруппа 1 CD2, CRACC, MPL, SLAMF7, CD319 и 19A24); лектиноподобной молекулы 1 C-типа (CLL-1 или CLECL1 - C-type lectin-like molecule-1); CD33; рецептора эпидермального фактора роста, вариант III (EGFRviii - epidermal growth factor receptor variant III); ганглиозида G2 (GD2 - ganglioside G2); ганглиозида GD3 (aNeu5Ac (2-8), aNeu5Ac (2-3) bDGalp (1-4) bDGlcP (1-1) Cer); белка созревания В-клеток члена семейства рецепторов TNF (BCMA - TNF receptor family member B cell maturation); антигена Tn ((Tn Ag) или (GalNAc α -Ser/Thr)); простат-специфического мембранного антигена (PSMA - prostate-specific membrane antigen); рецепторного тирозинкиназоподобного орфанного рецептора 1 (ROR1 - Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1); Fms подобной тирозинкиназы 3 (FLT3 - Fms Like Tyrosine Kinase 3); связанного с опухолью гликопротеина 72 (TAG72 - Tumor-associated glycoprotein 72); CD38; CD44v6; гликозилированного эпитопа CD43, экспрессируемого на клетках острого лейкоза или лимфомы, но не на гематопозитических предшественниках, гликозилированного эпитопа CD43, экспрессируемого на клетках негематопозитических раковых заболеваний, карциноэмбрионального антигена (CEA - Carcinoembryonic antigen); молекулы адгезии эпителиальных клеток (EPCAM - Epithelial cell adhesion molecule); V7H3 (CD276); KIT (CD117); субъединицы рецептора интерлейкина-13 альфа-2 (IL-13Ra2 (Interleukin-13 receptor subunit alpha-2) или CD213A2); мезотелина; рецептора интерлейкина 11 альфа (IL-11Ra - Interleukin 11 receptor alpha); антигена стволовых клеток

простаты (PSCA - prostate stem cell antigen); протеиназы серина 21 (тестизина или PRSS21 - Protease Serine 21); рецептора сосудистого эндотелиального фактора роста 2 (VEGFR2 - vascular endothelial growth factor receptor 2); антигена Льюиса (Y); CD24; бета-рецептора фактора роста, полученного из тромбоцитов (PDGFR-бета - Platelet-derived growth factor receptor beta); стадийно-специфического эмбрионального антигена-4 (SSEA-4 - Stage-specific embryonic antigen-4); CD20; альфа-рецептора фолата (FRa (Folate receptor alpha) или FR1); бета-рецептора фолата (FRb - Folate receptor beta); рецепторной тирозин-протеинкиназы ERBB2 (Her2/neu); муцина 1, связанного с клеточной поверхностью (MUC1 - Mucin 1, cell surface associated); рецептора эпидермального фактора роста (EGFR - epidermal growth factor receptor); молекулы адгезии нервных клеток (NCAM - neural cell adhesion molecule); простаза; простатической кислой фосфатазы (PAP - prostatic acid phosphatase); мутированного фактора удлинения 2 (ELF2M - elongation factor 2 mutated); эфрина B2; белка активации фибробластов альфа (FAP - fibroblast activation protein alpha); рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (рецептора IGF-I (insulin-like growth factor 1 receptor)), карбоангидразы IX (CAIX - carbonic anhydrase IX); субъединицы протеасомы (просомы, макропаина), бета-тип а, 9 (LMP2 - Proteasome (Prosome, Macropain) Subunit, Beta Type, 9); гликопротеина 100 (gp100); слитого белка-онкогена, состоящего из кластерной области точки разрыва (BCR) и гомолога 1 вирусного онкогена мышинной лейкемии Абельсона (Abl) (bcr-abl); тирозиназы; рецептора 2 эфрина типа А (EphA2 - ephrin type-A receptor 2); молекулы адгезии сиалил Льюиса (sLe - sialyl Lewis adhesion molecule); ганглиозида GM3 (aNeu5Ac (2-3) bDCIalp (1-4) bDGlcP (1-1) Cer); трансглутаминазы 5 (TGS5 - transglutaminase 5); высокомолекулярного антигена, ассоциированного с меланомой (HMWMAA - high molecular weight-melanoma associated antigen); о-ацетил-GD2 ганглиозида (OAcGD2 - o-acetyl-GD2 ganglioside); эндотелиального маркера 1 опухоли (TEM1 (tumor endothelial marker 1)/CD248); эндотелиального маркера 7 опухоли (TEM7R - tumor endothelial marker 7-related); клодина 6 (CLDN6 - claudin 6); рецептора гормонов, стимулирующих щитовидную железу (TSHR - thyroid stimulating hormone receptor); рецептора, связанного с G белком, класса C, группы 5, члена D (GPRC5D - G protein coupled receptor class C group 5, member D); открытая рамка считывания 61 хромосомы X (CXORF61 - chromosome X open reading frame 61); CD97; CD179a; киназы анапластической лимфомы (ALK - anaplastic lymphoma kinase); полисиаловой кислоты; специфичной для плаценты 1 (PLAC1 - Polysialic acid; placenta-specific 1); гексасахаридной части globoH гликоцерамида (GloboH - hexasaccharide portion of globoH glycoseramide); антигена дифференцировки молочной железы (NY-BR-1 - mammary gland differentiation antigen); уроплакина 2 (UPK2 - uroplakin 2); клеточного рецептора вируса гепатита А 1 (HAVCR1 - Hepatitis A virus cellular receptor 1); адренорецептора бета 3 (ADRB3 - adrenoreceptor beta 3); паннексина 3 (PANX3 - pannexin 3); G-белок-связанного рецептора 20 (GPR20 - G protein-coupled receptor 20); комплекса антигена 6 лимфоцитов, локуса К 9 (LY6K - lymphocyte antigen 6 complex, locus K 9); обонятельного рецептора 51E2 (OR51E2 - Olfactory receptor 51E2); белка альтернативной

рамки считывания ТКР гамма (TARP - TCR Gamma Alternate Reading Frame Protein); белка опухоли Вильмса (WT1 - Wilms tumor protein); антигена 1 рака/яичка (NY-ESO-1); антигена 2 рака/яичка (LAGE-1a); ассоциированного с меланомой антигена 1 (MAGE-A1 (Melanoma-associated antigen 1)); вариантного гена 6 ETS транслокации, расположенного на хромосоме 12p (ETV6-AML (ETS translocation-variant gene 6, located on chromosome 12p)); белка спермы 17 (SPA17 - sperm protein 17); члена 1A семейства X антигенов (XAGE1 - X Antigen Family, Member 1A); ангиопоэтинсвязывающего рецептора 2 клеточной поверхности (Tie 2 - angiopoietin-binding cell surface receptor 2); антигена-1 яичка рака меланомы (MAD-CT-1); антигена-2 яичка рака меланомы (MAD-CT-2 - melanoma cancer testis antigen-2); Fos-связанного антигена 1; опухолевого белка p53 (p53); мутанта p53; простерина; сурвивина; теломеразы; опухолевого антигена-1 рака карциномы простаты (PCT A-1 (prostate carcinoma tumor antigen-1) или Galectin 8), антигена 1 меланомы, распознаваемого Т-клетками (MelanA или MART1 (melanoma antigen recognized by T cells 1)); мутанта крысиной саркомы (Ras); обратной транскриптазы теломеразы человека (hTERT - human Telomerase reverse transcriptase); точек разрыва саркомы; ингибитора апоптоза меланомы (ML-IAP (melanoma inhibitor of apoptosis)); ERG (ген слияния трансмембранной протеазы серина 2 (TMPRSS2), ETS) (transmembrane protease, serine 2 (TMPRSS2) ETS fusion gene); N-ацетилглюкозаминилтрансферазы V (NA17 - N-Acetyl glucosaminyl-transferase V); белка с парными боксами Pax-3 (PAX3 - paired box protein Pax-3); андрогенного рецептора; циклина B1; гомолога, полученного из нейробластомы, вирусного онкогена v-мус птичьего миелоцитоматоза (MYCN - v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog); члена C семейства Ras гомологов (RhoC - Ras Homolog Family Member C); родственного тирозиназе белка 2 (TRP-2 - Tyrosinase-related protein 2); цитохрома P450 1B 1 (CYP1B 1 - Cytochrome P450 1B 1); подобного CCCTC-связывающему фактору (белку с цинковыми пальцами) (BORIS или брат регулятора сайтов импринтинга) (CCCTC-Binding Factor (Zinc Finger Protein)-Like (BORIS or Brother of the Regulator of imprinted Sites)), антигена 3 плоскоклеточной карциномы, распознаваемого Т-клетками (SART3 - Squamous Cell Carcinoma Antigen Recognized By T Cells 3); белка с парными боксами Pax-5 (PAX5 - Paired box protein Pax-5); проакрозин-связывающего белка sp32 (OY-TES1 - proacrosin binding protein sp32); лимфоцит-специфической протеинтирозинкиназы (LCK - lymphocyte-specific protein tyrosine kinase); якорного белка 4 киназы А (AKAP-4 - A kinase anchor protein 4); X точки разрыва 2 синовиальной саркомы (SSX2 - synovial sarcoma, X breakpoint 2); рецептора конечных продуктов усиленного гликирования (RAGE-1 - Receptor for Advanced Glycation Endproducts); почечного повсеместного 1 (RU1 - renal ubiquitous 1); почечного повсеместного 2 (RU2 - renal ubiquitous 2); легумаина; вируса папилломы человека Е6 (HPV E6 - human papilloma virus E6); вируса папилломы человека Е7 (HPV E7 - human papilloma virus E7); кишечной карбоксилэстеразы; мутированного белка теплового шока 70-2 (mut hsp70-2 - heat shock protein 70-2 mutated); CD79a; CD79b; CD72; связанного с

лейкоцитами иммуноглобулин-подобного рецептора 1 (LAIR1 - Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1); Fc-фрагмента рецептора IgA (FCAR (Fc fragment of IgA receptor) или CD89); члена 2 подгруппы А лейкоцитарного иммуноглобулиноподобного рецептора (LILRA2 - Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily A member 2); член f семейства, подобного молекуле CD300 (CD300LF - CD300 molecule-like family member f); член А семейства 12 доменов лектинов С-типа (CLEC12A - C-type lectin domain family 12 member A); антигена 2 стромальных клеток костного мозга (BST2 - bone marrow stromal cell antigen 2); белка 2 подобного EGF-подобный модуль-содержащему муцин-подобному рецептору гормонов (EMR2 - EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 2); лимфоцитарного антигена 75 (LY75 - lymphocyte antigen 75); глипикана-3 (GPC3 - Glypican-3); Fc-рецепторо-подобного 5 (FCRL5 - Fc receptor-like 5); и иммуноглобулин лямбда-подобного полипептида 1 (IGLL1 - immunoglobulin lambda-like polypeptide 1), MPL, биотина, с-MYC эпитопного тэга, CD34, LAMP1 TROP2, GFRalpha4, CDH17, CDH6, NYBR1, CDH19, CD200R, Slea (CA19.9; антиген сиалила Льюиса); Фукозил-GM1, PTK7, gpNMB, CDH1-CD324, DLL3, CD276/B7H3, ИЛ11Pa, ИЛ13Pa2, CD179b-IGL11, ТКРгамма-дельта, NKG2D, CD32 (FCGR2A), Tn антигена, Tim1-/HVFR1, CSF2RA (GMCSFR-альфа), TGFбетаP2, Люис антигена, цепи ТКР-бета1, цепи ТКР-бета2, цепи ТКР-гамма, цепи ТКР-дельта, FITC, рецептора леутенизирующего гормона (LHR - Leutenizing hormone receptor), рецептора фолликулостимулирующего гормона (FSHR - Follicle stimulating hormone receptor), рецептора гормона гонадотропина (CGHR (Gonadotropin Hormone receptor) или GR), CCR4, GD3, SLAMF6, SLAMF4, гликопротеина оболочки HIV1, HTLV1-Tax, CMV pp65, EBV-EBNA3c, KSHV K8.1, KSHV-gH, гемагглютинирина вируса гриппа А (HA), GAD, PDL1, гуанилил циклазы С (GCC - Guanylyl cyclase C), аутоантитела к десмоглеину 3 (Dsg3 - desmoglein 3), аутоантитела к десмоглеину 1 (Dsg1 - desmoglein 1), HLA, HLA-A, HLA-A2, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, HLA-G, IgE, CD99, Ras G12V, тканевого фактора 1 (TF1 - Tissue Factor 1), AFP, GPRC5D, Клаудина18.2 (CLD18A2 или CLDN18A.2), Р- гликопротеина, STEAP1, Liv1, Нектина-4, Крипто, gpA33, BST1/CD157, хлоридного канала с низкой проводимостью и антигена, распознаваемого антителом TNT.

6. Иммунная клетка или популяция указанной иммунной клетки по п. 1, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один не встречающийся в природе агент, способный к селективной активации NF-кВ пути выбран из группы, состоящей из vFLIP K13, K13-opt, NEMO мутанта, NEMO -слитого белка, ИКК1-S176E-S180E, ИКК2-S177E-S181E, RIP, ИКК α , ИКК β , Tcl-1, MyD88-L265, любого белка-активатора или фрагмента белка-активатора NF-кВ, любого ингибитора ингибитора пути NF-кВ, любой системы редактирования генов, способной селективно активировать NF-кВ, любого их гомолога или варианта и любой их комбинации.

7. Иммунная клетка или популяция указанной иммунной клетки по п. 1, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один не встречающийся в природе агент, способный к селективной активации NF-кВ пути имеет не-вирусное

происхождение.

8. Иммунная клетка или популяция указанной иммунной клетки по п. 1, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один не встречающийся в природе агент, способный к селективной активации NF-κB пути представляет собой систему редактирования генов.

9. Иммунная клетка или популяция указанной иммунной клетки по п. 1, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один не встречающийся в природе агент, способный к селективной активации NF-κB пути индуцирует олигомеризации NEMO/IKKγ.

10. Иммунная клетка или популяция указанной иммунной клетки по п. 1, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один не встречающийся в природе агент, способный к селективной активации NF-κB пути индуцирует активацию комплекса ИКК.

11. Иммунная клетка или популяция указанной иммунной клетки по п. 1, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один не встречающийся в природе агент, способный к селективной активации NF-κB пути, не активирует АКТ пути.

12. Иммунная клетка или популяция указанной иммунной клетки по п. 1, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один не встречающийся в природе агент, способный к селективной активации NF-κB пути, экспрессируется конститутивным или индуцируемым способом.

13. Иммунная клетка или популяция указанной иммунной клетки по п. 1, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один не встречающийся в природе агент, способный к селективной активации NF-κB пути, экспрессируется транзистентно.

14. Иммунная клетка или популяция указанной иммунной клетки по п. 1, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один не встречающийся в природе агент, способный к селективной активации NF-κB пути, экспрессируется стабильно.

15. Иммунная клетка или популяция указанной иммунной клетки по п. 1, отличающаяся тем, что активность по меньшей мере, одного не встречающегося в природе агента, способного к избирательной активации NF-κB пути, контролируется посттрансляционно через контактирование клетки с каким-либо соединением.

16. Иммунная клетка или популяция указанной иммунной клетки по п. 1, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один не встречающийся в природе агент, способный к селективной активации NF-κB пути экспрессируется в виде слитой конструкции с одним или более экземпляров домена-переключателя (switch domain).

17. Иммунная клетка или популяция указанной иммунной клетки по п. 9, отличающаяся тем, что активность по меньшей мере, одного не встречающегося в природе агента, способного к избирательной активации NF-κB пути контролируется на пост-трансляционном уровне путем введения терапевтически эффективного количества соединения, которое индуцирует димеризацию домена-переключателя.

18. Иммунная клетка или популяция указанной иммунной клетки по пп. 16 или 17,

отличающаяся тем, что указанный домен-переключатель содержит один или большее количество копий домена в FKBP12.

19. Иммунная клетка или популяция указанной иммунной клетки по п. 15, отличающаяся тем, что указанное соединение представляет собой AP20187 или римидуцид или его гомолог.

20. Иммунная клетка или популяция указанной иммунной клетки по п. 1, отличающаяся тем, что указанная иммунная клетка представляет собой Т-лимфоцит (Т клетки), CAR-Т клетку, TCR, экспрессирующую Т клетку, инфильтрирующий в опухоль лимфоцит (TIL), тканевый резидентный лимфоцит, стволовую клетку, индуцированную плюрипотентную стволовую клетку или клетку естественный килер (NK).

21. Иммунная клетка или популяция указанной иммунной клетки по п. 1, отличающаяся тем, что указанная иммунная клетка была сконструирована таким образом, чтобы отсутствовал ее собственный функциональный Т-клеточный рецепторный (TCR) сигнальный комплекс и/или beta 2 микроглобулин.

22. Иммунная клетка или популяция указанной иммунной клетки по пп.1 и 21, отличающаяся тем, что по меньшей мере один не встречающийся в природе иммунный рецептор, и/или по меньшей мере один агент, способный к селективной активации сигнального пути NF-κB клонируют в эндогенный ген TCR таким образом, что экспрессия указанного по меньшей мере одного не встречающегося в природе иммунного рецептора, и/или по меньшей мере, одного агента, способного к селективной активации сигнального пути NF-κB находятся под контролем эндогенных регуляторных элементов/промотора для гена TCR.

23. Иммунная клетка или популяция указанной иммунной клетки по п. 1, отличающаяся тем, что применяется для профилактики и лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из рака, инфекционных заболеваний, иммунных заболеваний и аллергических заболеваний.

24. Иммунная клетка или популяция указанной иммунной клетки по п. 1, отличающаяся тем, что по меньшей мере один полинуклеотид кодирует по меньшей мере один не встречающийся в природе иммунный рецептор и по меньшей мере один не встречающийся в природе агент, способный избирательно активировать сигнальный путь NF-κB экспрессируются с одного промотора.

25. Иммунная клетка или популяция указанной иммунной клетки по п. 1, отличающаяся тем, что по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один не встречающийся в природе иммунный рецептор и по меньшей мере один не встречающийся в природе агент, способный селективно активировать сигнальный путь NF-κB экспрессируется с использованием двух или большего количества отдельных промоторов.

26. Иммунная клетка или популяция указанной иммунной клетки по пп. 24 или 25, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один полинуклеотид содержит первую кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по

меньшей мере один не встречающийся в природе иммунный рецептор, отделенный от второй последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей не встречающийся в природе агент, способный селективно активировать NF-κB, так что при экспрессии указанных первой и второй последовательностей нуклеиновой кислоты, не встречающийся в природе иммунный рецептор и не встречающийся в природе агент, способный селективно активировать NF-κB, не связаны физически или химически.

27. Иммунная клетка или популяция указанной иммунной клетки по пп. 24 или 25, отличающаяся тем, что полинуклеотид(ы) кодирующие указанный по меньшей мере один не встречающийся в природе иммунный рецептор и/или, указанный по меньшей мере один не встречающийся в природе агент, способный избирательно активировать NF-κB клонируют в эндогенный ген TCR таким образом, что по меньшей мере один не встречающийся в природе иммунный рецептор и/или по меньшей мере один не встречающийся в природе агент, способный избирательно активировать NF-κB находятся под контролем эндогенных регуляторных элементов/промотора гена TCR.

28. Иммунная клетка или популяция иммунных клеток по пп. 21 или 27, отличающаяся тем, что одна или большее количество константных цепей генов TCR функционально реэкспрессированы.

29. По меньшей мере один рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один не встречающийся в природе иммунный рецептор, при этом указанный по меньшей мере один рекомбинантный полинуклеотид содержит:

(a) первой домен нуклеиновой кислоты кодирующий часть или весь трансмембранный и/или цитоплазматический домен, и, необязательно, внеклеточный домен эндогенного белка, при этом указанный эндогенный белок экспрессируется на поверхности лимфоцитов и вызывает активацию и/или пролиферацию указанных лимфоцитов;

(b) необязательно, полинуклеотидный линкер;

(c) второй домен нуклеиновой кислоты, функционально связанный с первым доменом нуклеиновой кислоты, при этом указанный второй домен нуклеиновой кислоты кодирует один или большее количество не встречающихся в природе антиген-связывающих доменов TCR;

(d) необязательный третий домен нуклеиновой кислоты, кодирующий костимуляторный домен; и

(e) необязательный дополнительный домен нуклеиновой кислоты, кодирующий вспомогательный модуль.

30. По меньшей мере один рекомбинантный полинуклеотид, содержащий:

первую нуклеиновую кислоту, кодирующую не встречающийся в природе иммунный рецептор; и

вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую вспомогательный модуль, содержащий селективный активатор NF-κB.

31. По меньшей мере один рекомбинантный полинуклеотид по п. 30,

отличающийся тем, что указанные первая нуклеиновая кислота и вторая нуклеиновая кислота разделены олигонуклеотидным линкером, кодирующим разрезаемый пептидный линкер.

32. По меньшей мере один рекомбинантный полинуклеотид по п. 30, содержащий два рекомбинантных полинуклеотида таким образом, что первая нуклеиновая кислота и вторая нуклеиновая кислота экспрессируются из отдельных векторов.

33. По меньшей мере один рекомбинантный полинуклеотид по п. 30, отличающийся тем, что указанный селективный активатор NF-κB представляет собой не встречающийся в природе селективный активатор NF-κB.

34. По меньшей мере один полинуклеотид по п.30, отличающийся тем, что указанный не встречающийся в природе иммунный рецептор выбран из группы, состоящей из CAR, Ab-TCR, TFP, cTCR, SIR и рекомбинантного TCR.

35. По меньшей мере один полинуклеотид по п.30, отличающийся тем, что указанный не встречающийся в природе иммунный рецептор содержит (i) внеклеточный антигенспецифический домен, (ii) трансмембранный домен и (iii) необязательный внутриклеточный сигнальный домен, содержащий иммунорецепторный мотив активации на основе тирозина (ITAM), при этом (iii) расположен на С-конце указанного не встречающегося в природе иммунного рецептора.

36. По меньшей мере один полинуклеотид по п. 30, отличающийся тем, что при экспрессии последовательностей указанных первой и второй нуклеиновых кислот полипептиды указанных не встречающегося в природе иммунного рецептора и селективного активатора NF-κB физически или химически не связаны между собой.

37. По меньшей мере один полинуклеотид по п. 35, отличающийся тем, что указанный внеклеточный антиген-специфический домен связывается с любым одним или несколькими из CD5; CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS1 (также называется как подгруппа 1 CD2, CRACC, MPL, SLAMF7, CD319 и 19A24); лектиноподобной молекулы 1 С-типа (CLL-1 или CLECL1); CD33; рецептора эпидермального фактора роста, вариант III (EGFRviii); ганглиозида G2 (GD2); ганглиозида GD3 (aNeu5Ac (2-8), aNeu5Ac (2-3) bDGalp (1-4) bDGlcp (1-1) Cer); белка созревания В-клеток члена семейства рецепторов TNF (BCMA); антигена Tn ((Tn Ag) или (GalNAcα-Ser/Thr)); простат-специфического мембранного антигена (PSMA); рецепторного тирозинкиназоподобного орфанного рецептора 1 (ROR1); Fms подобной тирозинкиназы 3 (FLT3); связанного с опухолью гликопротеина 72 (TAG72); CD38; CD44v6; гликозилированного эпитопа CD43, экспрессируемого на клетках острого лейкоза или лимфомы, но не на гематопоэтических предшественниках, гликозилированного эпитопа CD43, экспрессируемого на клетках негематопоэтических раковых заболеваний, карциноэмбрионального антигена (CEA); молекулы адгезии эпителиальных клеток (EPCAM); V7H3 (CD276); KIT (CD117); субъединицы рецептора интерлейкина-13 альфа-2 (IL-13Ra2 или CD213A2); мезотелина; рецептора интерлейкина 11 альфа (IL-11Ra); антигена стволовых клеток простаты (PSCA); протеиназы серина 21 (тестизина или PRSS21); рецептора сосудистого эндотелиального

фактора роста 2 (VEGFR2); антигена Льюиса (Y); CD24; бета-рецептора фактора роста, полученного из тромбоцитов (PDGFR-бета); стадийно-специфического эмбрионального антигена-4 (SSEA-4); CD20; альфа-рецептора фолата (FRa или FR1); бета-рецептора фолата (FRb); рецепторной тирозин-протеинкиназы ERBB2 (Her2/neu); муцина 1, связанного с клеточной поверхностью (MUC1); комплекса AFP/МНС; рецептора эпидермального фактора роста (EGFR); молекулы адгезии нервных клеток (NCAM); простаза; простатической кислой фосфатазы (PAP); мутированного фактора удлинения 2 (ELF2M); эфрина В2; белка активации фибробластов альфа (FAP); рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (рецептора IGF-I), карбоангидразы IX (CAIX); субъединицы протеасомы (просомы, макропаина), бета-тип а, 9 (LMP2); гликопротеина 100 (gp100); слитого белка-онкогена, состоящего из кластерной области точки разрыва (BCR) и гомолога 1 вирусного онкогена мышшиной лейкозы Абельсона (Abl) (bcr-abl); тирозиназы; рецептора 2 эфрина типа А (EphA2); молекулы адгезии сиалил Льюиса (sLe); ганглиозида GM3 (aNeu5Ac (2-3) bDCIalp (1-4) bDGlcp (1-1) Cer); трансглутаминазы 5 (TGS5); высокомолекулярного антигена, ассоциированного с меланомой (HMWMAA); о-ацетил-GD2 ганглиозида (OAcGD2); эндотелиального маркера 1 опухоли (TEM1/CD248); эндотелиального маркера 7 опухоли (TEM7R); клодина 6 (CLDN6); рецептора гормонов, стимулирующих щитовидную железу (TSHR); рецептора, связанного с G белком, класса C, группы 5, члена D (GPRC5D); открытая рамка считывания 61 хромосомы X (CXORF61); CD97; CD179a; киназы анапластической лимфомы (ALK); полисиаловой кислоты; специфичной для плаценты 1 (PLAC1); гексасахаридной части globoH гликоцерамида (GloboH); антигена дифференцировки молочной железы (NY-BR-1); уроплакина 2 (UPK2); клеточного рецептора вируса гепатита А 1 (HAVCR1); адренорецептора бета 3 (ADRB3); паннексина 3 (PANX3); G-белок-связанного рецептора 20 (GPR20); комплекса антигена 6 лимфоцитов, локуса К 9 (LY6K); обонятельного рецептора 51E2 (OR51E2); белка альтернативной рамки считывания TCR гамма (TARP); белка опухоли Вильмса (WT1); комплекса WT1/МНС I; антигена 1 рака/яичка (NY-ESO-1); комплекса NY-ESO-1/МНС I; антигена 2 рака/яичка (LAGE-1a); ассоциированного с меланомой антигена 1 (MAGE-A1); вариантного гена 6 ETS транслокации, расположенного на хромосоме 12p (ETV6-OMJ); белка спермы 17 (SPA17); члена 1А семейства X антигенов (XAGE1); ангиопоэтинсвязывающего рецептора 2 клеточной поверхности (Tie 2); антигена-1 яичка рака меланомы (MAD-CT-1); антигена-2 яичка рака меланомы (MAD-CT-2); Fos-связанного антигена 1; опухолевого белка p53 (p53); мутанта p53; простерина; сурвивина; теломеразы; опухолевого антигена-1 рака карциномы простаты (PCT A-1 или Galectin 8), антигена 1 меланомы, распознаваемого Т-клетками (MelanA или MART1); мутанта крысиной саркомы (Ras); обратной транскриптазы теломеразы человека (hTERT); точек разрыва саркомы; ингибитора апоптоза меланомы (ML-IAP); ERG (ген слияния трансмембранной протеазы серина 2 (TMPRSS2), ETS); N-ацетилглюкозаминилтрансферазы V (NA17); белка с парными боксами Pax-3 (PAX3); андрогенного рецептора; циклина В1; гомолога, полученного из нейробластомы,

вирусного онкогена v-мус птичьего миелоцитоматоза (MYCN); члена С семейства Ras гомологов (RhoC); родственного тирозиназе белка 2 (TRP-2); цитохрома P450 1B 1 (CYP1B 1); подобного СССТС-связывающему фактору (белку с цинковыми пальцами) (BORIS или брат регулятора сайтов импринтинга), антигена 3 плоскоклеточной карциномы, распознаваемого Т-клетками (SART3); белка с парными боксами Pax-5 (PAX5); проакрозин-связывающего белка sp32 (OY-TE51); лимфоцит-специфической протеинтирозинкиназы (LCK); якорного белка 4 киназы А (AKAP-4); Х точки разрыва 2 синовиальной саркомы (SSX2); рецептора конечных продуктов усиленного гликирования (RAGE-1); почечного повсеместного 1 (RU1); почечного повсеместного 2 (RU2); легумаина; вируса папилломы человека Е6 (HPV E6); комплекса HPV E6/МНС I ;вируса папилломы человека Е7 (HPV E7); комплекса HPV E7/МНС I; комплекса AFP/МНС I; комплекса Ras/МНС I; кишечной карбоксилэстеразы; мутированного белка теплового шока 70-2 (mut hsp70-2); CD79a; CD79b; CD72; связанного с лейкоцитами иммуноглобулин-подобного рецептора 1 (LAIR1); Fc-фрагмента рецептора IgA (FCAR или CD89); члена 2 подгруппы А лейкоцитарного иммуноглобулиноподобного рецептора (LILRA2); член f семейства, подобного молекуле CD300 (CD300LF); член А семейства 12 доменов лектинов С-типа (CLEC12A); антигена 2 стромальных клеток костного мозга (BST2); белка 2 подобного EGF-подобный модуль-содержащему муцин-подобному рецептору гормонов (EMR2); лимфоцитарного антигена 75 (LY75); глипикана-3 (GPC3); Fc-рецепторо-подобного 5 (FCRL5); и иммуноглобулин лямбда-подобного полипептида 1 (IGLL1), MPL, биотина, с-MYC эпитопного тэга, CD34, LAMP1 TROP2, GFRalpha4, CDH17, CDH6, NYBR1, CDH19, CD200R, SleA (CA19.9; антиген сиалила Льюиса); Фукозил-GM1, PTK7, gpNMB, CDH1-CD324, DLL3, CD276/B7H3, IL11Ra, IL13Ra2, CD179b-IGLL1, TCRгамма-дельта, NKG2D, CD32 (FCGR2A), Tn антигена, Tim1-/HVFR1, CSF2RA (GMCSFR-альфа), TGFбетаP2, Люис антигена, цепи TCR-бета1, цепи TCR-бета2, цепи TCR-гамма, цепи TCR-дельта, FITC, рецептора леутенизирующего гормона (LHR), рецептора фолликулостимулирующего гормона (FSHR), рецептора гормона гонадотропина (CGHR или GR), CCR4, GD3, SLAMF6, SLAMF4, гликопротеина оболочки HIV1, HTLV1-Tax, CMV pp65, EBV-EBNA3c, KSHV K8.1, KSHV-gH, гемагглютинаина вируса гриппа А (HA), GAD, PDL1, гуанилил циклазы С (GCC), аутоантитела к десмоглеину 3 (Dsg3), аутоантитела к десмоглеину 1 (Dsg1), HLA, HLA-A, HLA-A2, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA -DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, HLA-G, IgE, CD99, Ras G12V, тканевого фактора 1 (TF1), AFP, GPRC5D, Клаудина18.2 (CLD18A2 или CLDN18A.2), Р- гликопротеина, STEAP1, Liv1, нектина-4, Кристо, gpA33, BST1/CD157, хлоридного канала с низкой проводимостью и антигена, распознаваемого антителом TNT.

38. По меньшей мере один полинуклеотид по п. 30, отличающийся тем, что агент, способный к селективной активации NF-кВ пути выбран из группы, состоящей из vFLIP K13, NEMO мутанта, NEMO -слитого белка, IKK1-S176E-S180E, IKK2-S177E-S181E, RIP, FKBPx2-RIP-ID, IKK1, FKBPx2-IKKa, IKK2, FKBPx2-IKK2, Tcl-1, MyD88-L265, любого белка-активатора или фрагмента белка-активатора NF-кВ, любого ингибитора ингибитора

сигнального пути NF-κB, любой системы редактирования генов, способной селективно активировать NF-κB, любого их гомолога или варианта и любой их комбинации.

39. По меньшей мере один полинуклеотид по п. 37, отличающийся тем, что указанный селективный активатор NF-κB экспрессируется в виде слитой конструкции с одной или несколькими копиями домена FKBP.

40. Полинуклеотид по п. 35, отличающийся тем, что внеклеточный антигенспецифический домен выбирают из группы, состоящей из:

- вариабельной области тяжелой цепи (vH) антитела или его фрагмента, специфичной к предварительно определенному антигену-мишени;
- вариабельной области легкой цепи (vL) антитела или его фрагмента, специфичной к предварительно определенному антигену-мишени;
- одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv) или его фрагмента, специфичного к предварительно определенным антигенам-мишеням;
- фрагмента антитела (*например*, Fv, Fab, а (Fab')₂), специфичного к предварительно определенному антигену-мишени;
- фрагментов однодоменного антитела (SDAB) специфичных к предварительно определенному антигену-мишени;
- vHH домена верблюжьих, специфичного к предварительно определенному антигену-мишени;
- неиммуноглобулиновых антигенсвязывающих каркасов, специфичных к предварительно определенному антигену-мишени;
- рецепторов или их фрагментов специфичных к предварительно определенному антигену-мишени;
- лигандов или их фрагментов, специфичных к предварительно определенному антигену-мишени;
- биспецифических антитела, фрагмента антитела, scFv, vHH, SDAB, не иммуноглобулинового связывающего антиген каркаса, рецептора или лиганда, специфичных к одному или нескольким предопределенным антигенам-мишеням; и
- аутоантигена или его фрагмента.

41. По меньшей мере один вектор, содержащий по меньшей мере один полинуклеотид по любому из пп. 30-40.

42. По меньшей мере один вектор по п. 41, отличающийся тем, что указанный вектор выбран из группы, состоящей из ДНК - вектора, РНК-вектора, плазмиды, лентивирусного вектора, аденовирусного вектора, AAV вектора, ретровирусного вектора, бакуловирусного вектора, вектора на основе транспозона спящая красавица (*sleeping beauty*) и вектора на основе транспозона пиггибэк (*piggybac*).

43. Иммунная эффекторная клетка или стволовая клетка, содержащие по меньшей мере один рекомбинантный полинуклеотид по любому из пп. 30-40.

44. Иммунная эффекторная клетка или стволовая клетка, содержащие по меньшей мере один вектор по п. 41.

45. Иммунная эффекторная клетка или стволовая клетка, содержащие по меньшей мере один вектор по п. 42.

46. Антигенпрезентирующая клетка, содержащая по меньшей мере один вектор по п. 41.

47. Иммунная эффекторная клетка или стволовая клетка по любому из пп. 43-45, отличающиеся тем, что указанная иммунная эффекторная клетка является Т клеткой человека, НКТ клеткой человека или синтетической Т клеткой, НК клеткой, или стволовой клеткой, которая может давать начало иммунной эффекторной клетке, необязательно, при этом указанная Т клетка дефицитна по диаглицеролкиназе (DGK - diacylglycerol kinase) и/или I κ B α и/или дефицитна по Brd4.

48. Способ (i) продления срока жизни экспрессирующей иммунной клетки, (ii) стимуляции пролиферации иммунной клетки, (iii) стимуляции выработки цитокинов иммунной клеткой, (iv) улучшения презентации антигена посредством иммунной клетки (v) защиты иммунной клетки от апоптоза, при этом указанный способ включает трансфекцию или трансформацию иммунных клеток полинуклеотидом, кодирующим селективный активатор NF- κ B или NF- κ B-специфический стимулирующий полипептид.

49. Способ по п. 48, отличающийся тем, что селективный NF- κ B активатор или NF- κ B специфический стимулирующий полипептид выбраны из группы, состоящей из vFLIP K13, K13-opt, мутанта NEMO, слитого белка NEMO, IKK1- S176E-S180E, IKK2-S177E-S181E, RIP, IKK α , IKK β , Tcl-1, MyD88-L265, любого белка-активатора или фрагмент белка-активатора NF- κ B, любого ингибитора ингибитора сигнального пути NF- κ B, любого их гомолога или их варианта и любой их комбинации.

50. Способ по п. 49, отличающийся тем, что полипептид селективного NF- κ B активатора или NF- κ B специфический стимулирующий полипептид экспрессируются конститутивным или индуцируемым способом.

51. Способ по п. 50, отличающийся тем, что полипептид селективного NF- κ B активатора или NF- κ B стимулирующий полипептид контролируются посттрансляционно через приведение Т клеток в контакт с каким-либо соединением.

52. Способ по п. 50, отличающийся тем, что полипептид селективного NF- κ B активатора или NF- κ B специфический стимулирующий полипептид экспрессируются в виде слитой конструкции с одним или более экземпляров домена FKBP.

53. Способ по п. 52, отличающийся тем, что активность полипептида селективного NF- κ B активатора или NF- κ B специфического стимулирующего полипептида контролируется на пост-трансляционном уровне путем введения терапевтически эффективного количества соединения, которое индуцирует димеризацию домена FKBP.

54. Способ по п. 51, отличающийся тем, что указанное соединение представляет собой AP20187 или римидуцид.

55. Способ получения иммунной эффекторной клетки экспрессирующей не встречающийся в природе иммунный рецептор, включающий введение по меньшей мере одного вектора по п. 41 или по меньшей мере одного рекомбинантного полинуклеотида по

п. 29 в иммунную эффекторную клетку или гематопозитическую стволовую клетку или клетку-предшественник, которые могут дать начало иммунной эффекторной клетке, в условиях, при которых экспрессируется указанный не встречающийся в природе иммунный рецептор, а иммунная эффекторная клетка обладает (i) увеличенной продолжительностью жизни, (ii) улучшенной пролиферацией в случае Т-клеток и/или (iii) пониженным апоптозом по сравнению с клеткой CAR-T, в которой отсутствует специфический стимулирующий полипептид NF-κB.

56. Способ по п. 55, дополнительно включающий:

- a) обеспечение популяции иммунных эффекторных клеток; и
- b) удаление Т-регуляторных клеток из популяции, тем самым обеспечивая популяцию деплетированную от Т-регуляторных клеток;

при этом стадии a) и b) проводят перед введением вектора или рекомбинантного полинуклеотида, кодирующего CAR и/или NF-κB-специфический стимулирующий полипептид в популяцию.

57. Способ по п. 56, отличающийся тем, что Т-регуляторные клетки удаляют из популяции клеток с использованием антитела против CD25 или антитела против GITR.

58. Способ по п. 55, дополнительно включающий:

- a) обеспечение популяции иммунных эффекторных клеток; и
- b) обогащение популяции Р-гликопротеин (P-gp или Pgp; MDR1, ABCB1, CD243) - позитивными клетками, обеспечивая тем самым Р-гликопротеин (P-gp или Pgp; MDR1, ABCB1, CD243) -обогащенную популяцию клеток ;

при этом стадии a) и b) проводят до или после введения вектора или рекомбинантного полинуклеотида, кодирующего CAR и/или NF-κB-специфический стимулирующий полипептид.

59. Способ по п. 58, отличающийся тем, что обогащение Р-гликопротеин-положительными клетками проводят с применением любого одного или большего количества способов, выбранных из группы, состоящей из:

i) иммуноселекции с использованием одного или смеси специфических антител к Р-гликопротеину,

ii) окрашивания одним или несколькими флуоресцентными красителями, которые являются субстратами Р-гликопротеина (метилового эфира тетраметилродамина (TMRM - tetramethylrhodamine methyl ester), адриамицина и актиномицина-D) в условиях, при которых Р-гликопротеин активен в качестве насоса и происходит обогащение клетками, которые меньше окрашиваются указанным красителем,

iii) отбора клеток, устойчивых к фототоксическим соединениям, являющимся субстратами Р-гликопротеина, таким как любой один или большее количество из ТН9402, гидрохлорид метилового эфира 2- (4,5-дибром-6-амино-3-имино-3Н-ксантен-9-ил) бензойной кислоты, гидрохлорид этилового эфира 2- (4,5-дибром-6-амино-3-имино-3Н-ксантен-9-ил) бензойной кислоты, гидрохлорид октилового эфира 2- (4,5-дибром-6-амино-3-имино-3Н-ксантен-9-ил) бензойной кислоты, гидрохлорид n-бутилового эфира 2- (4,5-

дибром-6-амино-3-имино-3Н-ксантен-9-ил) бензойной кислоты, гидрохлорид *n*-бутилового эфира 2-(6-этиламино-3-этилимино-3Н-ксантен-9-ил) -бензойной кислоты или их производных или их комбинаций, и

iv) отбор клеток, устойчивых к цитотоксическим соединениям, являющимся субстратами Р-гликопротеина, таким как винкристин, винбластин, таксол, паклитаксел, митоксантрон, этопозид, адриамицин, даунорубицин и актиномицин-D.

60. Способ генерирования популяции сконструированных с помощью РНК клеткок, включающий введение *in vitro* транскрибированной РНК или нескольких/многих транскрибированных РНК или синтетической РНК или нескольких/многих синтетических РНК в клетку или популяцию клеток, при этом указанные РНК или несколько/многие РНК содержат рекомбинантный полинуклеотид или полинуклеотиды по п. 30.

61. Способ обеспечения иммунитета против заболевания у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества иммунных эффекторных клеток или стволовых клеток, которые могут привести к возникновению иммунных эффекторных клеток по любому из пп 43-47, в котором клетка представляет собой аутологичную Т клетку или аллогенную Т клетку, или аутологичную НКТ-клетку, или аллогенную НКТ-клетку, или аутологичную или аллогенную гемопоэтическую стволовую клетку, или аутологичную или аллогенную iPSC, которая может давать иммунную эффекторную клетку.

62. Способ по п. 61, отличающийся тем, что указанные аллогенная Т клетка или аллогенная НКТ-клетка или гемопоэтическая стволовая клетка или iPSC не экспрессируют или имеют низкую экспрессию функционального TCR или функционального HLA.

63. Композиция, содержащая иммунную эффекторную клетку или стволовую клетку, которые могут генерировать иммунные эффекторные клетки, содержащие не встречающийся в природе иммунный рецептор и селективный активатор NF-κB, отличающаяся тем, что указанный не встречающийся в природе иммунный рецептор содержит антигенсвязывающие домены, которые связываются с ассоциированным с заболеванием антигеном, при этом указанный ассоциированный с заболеванием антиген, выбран из группы, состоящей из: CD5; CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS-1 (также называется как подгруппа 1 CD2, CRACC, SLAMF7, CD319 и 19A24); лектиноподобной молекулы 1 С-типа (CLL-1 или CLECL1); CD33; рецептора эпидермального фактора роста, вариант III (EGFRviii); ганглиозида G2 (GD2); ганглиозида GD3 (aNeu5Ac (2-8), aNeu5Ac (2-3) bDGalp (1-4) bDGlc (1-1) Cer); белка созревания В-клеток члена семейства рецепторов TNF (BCMA); антигена Tn ((Tn Ag) или (GalNAcα-Ser/Thr)); простат-специфического мембранного антигена (PSMA); рецепторного тирозинкиназоподобного орфанного рецептора 1 (ROR1); Fms подобной тирозинкиназы 3 (FLT3); связанного с опухолью гликопротеина 72 (TAG72); CD38; CD44v6; гликозилированного эпитопа CD43, экспрессируемого на клетках острого лейкоза или лимфомы, но не на гемопоэтических предшественниках, гликозилированного эпитопа CD43, экспрессируемого на клетках

негематопозитических раковых заболеваний, карциноэмбрионального антигена (CEA); молекулы адгезии эпителиальных клеток (EPCAM); V7H3 (CD276); KIT (CD117); субъединицы рецептора интерлейкина-13 альфа-2 (IL-13Ra2 или CD213A2); мезотелина; рецептора интерлейкина 11 альфа (IL-11Ra); антигена стволовых клеток простаты (PSCA); протеиназы серина 21 (тестизина или PRSS21); рецептора сосудистого эндотелиального фактора роста 2 (VEGFR2); антигена Льюиса (Y); CD24; бета-рецептора фактора роста, полученного из тромбоцитов (PDGFR-бета); стадийно-специфического эмбрионального антигена-4 (SSEA-4); CD20; альфа-рецептора фолата; рецепторной тирозин-протеинкиназы ERBB2 (Her2/neu); муцина 1, связанного с клеточной поверхностью (MUC1); рецептора эпидермального фактора роста (EGFR); молекулы адгезии нервных клеток (NCAM); простаза; простатической кислой фосфатазы (PAP); мутированного фактора удлинения 2 (ELF2M); эфрина B2; белка активации фибробластов альфа (FAP); рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (рецептора IGF-I), карбоангидразы IX (CAIX); субъединицы протеасомы (просомы, макропаина), бета-тип а, 9 (LMP2); гликопротеина 100 (gp100); слитого белка-онкогена, состоящего из кластерной области точки разрыва (BCR) и гомолога 1 вирусного онкогена мышшиной лейкозы Абельсона (Abl) (bcr-abl); тирозиназы; рецептора 2 эфрина типа A (EphA2); фукозила GM1, молекулы адгезии сиалил Льюиса (sLe); ганглиозида GM3 (aNeu5Ac (2-3) bDCIalp (1-4) bDGlc (1-1) Cer); трансглутаминазы 5 (TGS5); высокомолекулярного антигена, ассоциированного с меланомой (HMWMAA); о-ацетил-GD2 ганглиозида (OAcGD2); эндотелиального маркера 1 опухоли (TEM1/CD248); эндотелиального маркера 7 опухоли (TEM7R); клодина 6 (CLDN6); рецептора гормонов, стимулирующих щитовидную железу (TSHR); рецептора, связанного с G белком, класса C, группы 5, члена D (GPRC5D); открытая рамка считывания 61 хромосомы X (CXORF61); CD97; CD179a; киназы анапластической лимфомы (ALK); полисиаловой кислоты; специфичной для плаценты 1 (PLAC1); гексахаридной части globoH гликоцерамида (GloboH); антигена дифференцировки молочной железы (NY-BR-1); уроплакина 2 (UPK2); клеточного рецептора вируса гепатита А 1 (HAVCR1); адренорецептора бета 3 (ADRB3); паннексина 3 (PANX3); G-белок-связанного рецептора 20 (GPR20); комплекса антигена 6 лимфоцитов, локуса К 9 (LY6K); обонятельного рецептора 51E2 (OR51E2); белка альтернативной рамки считывания TCR гамма (TARP); белка опухоли Вильмса (WT1); антигена 1 рака/яичка (NY-ESO-1); антигена 2 рака/яичка (LAGE-1a); ассоциированного с меланомой антигена 1 (MAGE-A1); вариантного гена 6 ETS транслокации, расположенного на хромосоме 12p (ETV6-OML); белка спермы 17 (SPA17); члена 1A семейства X антигенов (XAGE1); ангиопоэтинсвязывающего рецептора 2 клеточной поверхности (Tie 2); антигена-1 яичка рака меланомы (MAD-CT-1); антигена-2 яичка рака меланомы (MAD-CT-2); Fos-связанного антигена 1; опухолевого белка p53 (p53); мутанта p53; простерина; сурвивина; теломеразы; опухолевого антигена-1 рака карциномы простаты (PCT A-1 или Galectin 8), антигена 1 меланомы, распознаваемого Т-клетками (MelanA или MART1); мутанта крысиной саркомы (Ras); обратной транскриптазы теломеразы человека (hTERT); точек

разрыва саркомы; ингибитора апоптоза меланомы (ML-IAP); ERG (ген слияния трансмембранной протеазы серина 2 (TMPRSS2), ETS); N-ацетилглюкозаминилтрансферазы V (NA17); белка с парными боксами Pax-3 (PAX3); андрогенного рецептора; циклина B1; гомолога, полученного из нейробластомы, вирусного онкогена v-мус птичьего миелоцитоматоза (MYCN); члена C семейства Ras гомологов (RhoC); родственного тирозиназе белка 2 (TRP-2); цитохрома P450 1B 1 (CYP1B 1); подобного CCCTC-связывающему фактору (белку с цинковыми пальцами) (BORIS или брат регулятора сайтов импринтинга), антигена 3 плоскоклеточной карциномы, распознаваемого T-клетками (SART3); белка с парными боксами Pax-5 (PAX5); проакрозин-связывающего белка sp32 (OY-TES1); лимфоцит-специфической протеинтирозинкиназы (LCK); якорного белка 4 киназы A (AKAP-4); X точки разрыва 2 синовиальной саркомы (SSX2); рецептора конечных продуктов усиленного гликирования (RAGE-1); почечного повсеместного 1 (RU1); почечного повсеместного 2 (RU2); легумаина; вируса папилломы человека E6 (HPV E6); вируса папилломы человека E7 (HPV E7); кишечной карбоксилэстеразы; мутированного белка теплового шока 70-2 (mut hsp70-2); CD79a; CD79b; CD72; связанного с лейкоцитами иммуноглобулин-подобного рецептора 1 (LAIR1); Fc-фрагмента рецептора IgA (FCAR или CD89); члена 2 подгруппы A лейкоцитарного иммуноглобулиноподобного рецептора (LILRA2); член f семейства, подобного молекуле CD300 (CD300LF); член A семейства 12 доменов лектинов C-типа (CLEC12A); антигена 2 стромальных клеток костного мозга (BST2); белка 2 подобного EGF-подобный модуль-содержащему муцин-подобному рецептору гормонов (EMR2); лимфоцитарного антигена 75 (LY75); глипикана-3 (GPC3); Fc-рецепторо-подобного 5 (FCRL5); и иммуноглобулин лямбда-подобного полипептида 1 (IGLL1), MPL, биотина, с-MYC эпителиального тэга, CD34, LAMP1 TROP2, GFRalpha4, CDH17, CDH6, NYBR1, CDH19, CD200R, SleA (CA19.9; антиген сиалила Льюиса); Фукозил-GM1, PTK7, gpNMB, CDH1-CD324, DLL3, CD276/B7H3, IL11Ra, IL13Ra2, CD179b-IGL1, ALK TCR гамма-дельта, NKG2D, CD32 (FCGR2A), CSPG4-HMW-MAA, Tim1-/HVFR1, CSF2RA (GMCSFR-альфа), TGFбетаP2, VEGFR2/KDR, Льюис антигена, цепи TCR-бета1, цепи TCR-бета2, цепи TCR-гамма, цепи TCR-дельта, FITC, рецептора леутенизирующего гормона (LHR), рецептора фолликулостимулирующего гормона (FSHR), рецептора гормона хорионического гонадотропина (CGHR), CCR4, SLAMF6, SLAMF4, гликопротеина оболочки HIV1, HTLV1-Tax, CMV pp65, EBV-EBNA3c, гемагглютинирина вируса гриппа A (HA), GAD, PDL1, гуанилил циклазы C (GCC), белка KSHV-K8.1, белка KSHV-gH, аутоантитела к десмоглеину 3 (Dsg3), аутоантитела к десмоглеину 1 (Dsg1), HLA, HLA-A, HLA-A2, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA -DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, HLA-G, IgE, CD99, Ras G12V, тканевого фактора 1 (TF1), AFP, GPRC5D, Клаудина18.2 (CLD18A2 или CLDN18A.2), P- гликопротеина, STEAP1, Liv1, нектин-4, Кристо, gpA33, BST1/CD157, хлоридного канала с низкой проводимостью и антигена, распознаваемого антителом TNT.

64. Способ лечения или профилактики заболевания, связанного с экспрессией ассоциированного с заболеванием антигена у субъекта, включающий введение субъекту

эффективного количества иммунных эффекторных клеток, содержащих не встречающийся в природе иммунный рецептор и селективный активатор NF-κB, в котором указанный не встречающийся в природе иммунный рецептор содержит антигенсвязывающие домены, которые связываются с ассоциированным с заболеванием антигеном, при этом указанный ассоциированный с заболеванием антиген выбран из группы, состоящей из: CD5; CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS1 (также называется как подгруппа 1 CD2, CRACC, SLAMF7, CD319 и 19A24); лектиноподобной молекулы 1 С-типа (CLL-1 или CLECL1); CD33; рецептора эпидермального фактора роста, вариант III (EGFRviii); ганглиозида G2 (GD2); ганглиозида GD3 (aNeu5Ac (2-8), aNeu5Ac (2-3) bDGalp (1-4) bDGlcP (1-1) Cer); белка созревания В-клеток члена семейства рецепторов TNF (BCMA); антигена Tn ((Tn Ag) или (GalNAcα-Ser/Thr)); простат-специфического мембранного антигена (PSMA); рецепторного тирозинкиназоподобного орфанного рецептора 1 (ROR1); Fms подобной тирозинкиназы 3 (FLT3); связанного с опухолью гликопротеина 72 (TAG72); CD38; CD44v6; гликозилированного эпитопа CD43, экспрессируемого на клетках острого лейкоза или лимфомы, но не на гематопоэтических предшественниках, гликозилированного эпитопа CD43, экспрессируемого на клетках негематопоэтических раковых заболеваний, карциноэмбрионального антигена (CEA); молекулы адгезии эпителиальных клеток (EPCAM); V7H3 (CD276); KIT (CD117); субъединицы рецептора интерлейкина-13 альфа-2 (IL-13Ra2 или CD213A2); мезотелина; рецептора интерлейкина 11 альфа (IL-11Ra); антигена стволовых клеток простаты (PSCA); протеиназы серина 21 (тестизина или PRSS21); рецептора сосудистого эндотелиального фактора роста 2 (VEGFR2); антигена Льюиса (Y); CD24; бета-рецептора фактора роста, полученного из тромбоцитов (PDGFR-бета); стадийно-специфического эмбрионального антигена-4 (SSEA-4); CD20; альфа-рецептора фолата; рецепторной тирозин-протеинкиназы ERBB2 (Her2/neu); муцина 1, связанного с клеточной поверхностью (MUC1); рецептора эпидермального фактора роста (EGFR); молекулы адгезии нервных клеток (NCAM); простаза; простатической кислой фосфатазы (PAP); мутированного фактора удлинения 2 (ELF2M); эфрина В2; белка активации фибробластов альфа (FAP); рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (рецептора IGF-I), карбоангидразы IX (CAIX); субъединицы протеасомы (просомы, макропаина), бета-тип а, 9 (LMP2); гликопротеина 100 (gp100); слитого белка-онкогена, состоящего из кластерной области точки разрыва (BCR) и гомолога 1 вирусного онкогена мышшиной лейкемии Абельсона (Abl) (bcr-abl); тирозиназы; рецептора 2 эфрина типа А (EphA2); фукозила GM1, молекулы адгезии сиалил Льюиса (sLe); ганглиозида GM3 (aNeu5Ac (2-3) bDClalp (1-4) bDGlcP (1-1) Cer); трансглутаминазы 5 (TGS5); высокомолекулярного антигена, ассоциированного с меланомой (HMWMAA); о-ацетил-GD2 ганглиозида (OAcGD2); эндотелиального маркера 1 опухоли (TEM1/CD248); эндотелиального маркера 7 опухоли (TEM7R); клодина 6 (CLDN6); рецептора гормонов, стимулирующих щитовидную железу (TSHR); рецептора, связанного с G белком, класса С, группы 5, члена D (GPRC5D); открытая рамка считывания 61 хромосомы X (CXORF61); CD97; CD179a; киназы анапластической

лимфомы (ALK); полисиаловой кислоты; специфичной для плаценты 1 (PLAC1); гексахаридной части глобоН гликоцерамида (GloboH); антигена дифференцировки молочной железы (NY-BR-1); уроплакина 2 (UPK2); клеточного рецептора вируса гепатита А 1 (HAVCR1); адренорецептора бета 3 (ADRB3); паннексина 3 (PANX3); G-белок-связанного рецептора 20 (GPR20); комплекса антигена 6 лимфоцитов, локуса К 9 (LY6K); обонятельного рецептора 51E2 (OR51E2); белка альтернативной рамки считывания TCR гамма (TARP); белка опухоли Вильмса (WT1); антигена 1 рака/яичка (NY-ESO-1); антигена 2 рака/яичка (LAGE-1a); ассоциированного с меланомой антигена 1 (MAGE-A1); вариантного гена 6 ETS транслокации, расположенного на хромосоме 12p (ETV6-OMJL); белка спермы 17 (SPA17); члена 1А семейства X антигенов (XAGE1); ангиопоэтинсвязывающего рецептора 2 клеточной поверхности (Tie 2); антигена-1 яичка рака меланомы (MAD-CT-1); антигена-2 яичка рака меланомы (MAD-CT-2); Fos-связанного антигена 1; опухолевого белка p53 (p53); мутанта p53; простерина; сурвивина; теломеразы; опухолевого антигена-1 рака карциномы простаты (PCT A-1 или Galectin 8), антигена 1 меланомы, распознаваемого Т-клетками (MelanA или MART1); мутанта крысиной саркомы (Ras); обратной транскриптазы теломеразы человека (hTERT); точек разрыва саркомы; ингибитора апоптоза меланомы (ML-IAP); ERG (ген слияния трансмембранной протеазы серина 2 (TMPRSS2), ETS); N-ацетилглюкозаминилтрансферазы V (NA17); белка с парными боксами Pax-3 (PAX3); андрогенного рецептора; циклина B1; гомолога, полученного из нейробластомы, вирусного онкогена v-мус птичьего миелоцитоматоза (MYCN); члена C семейства Ras гомологов (RhoC); родственного тирозиназе белка 2 (TRP-2); цитохрома P450 1B 1 (CYP1B 1); подобного CCCTC-связывающему фактору (белку с цинковыми пальцами) (BORIS или брат регулятора сайтов импринтинга), антигена 3 плоскоклеточной карциномы, распознаваемого Т-клетками (SART3); белка с парными боксами Pax-5 (PAX5); проакрозин-связывающего белка sp32 (OY-TE51); лимфоцит-специфической протеинтирозинкиназы (LCK); якорного белка 4 киназы А (AKAP-4); X точки разрыва 2 синовиальной саркомы (SSX2); рецептора конечных продуктов усиленного гликирования (RAGE-1); почечного повсеместного 1 (RU1); почечного повсеместного 2 (RU2); легумаина; вируса папилломы человека E6 (HPV E6); вируса папилломы человека E7 (HPV E7); кишечной карбоксилэстеразы; мутированного белка теплового шока 70-2 (mut hsp70-2); CD79a; CD79B; CD72; связанного с лейкоцитами иммуноглобулин-подобного рецептора 1 (LAIR1); Fc-фрагмента рецептора IgA (FCAR или CD89); члена 2 подгруппы А лейкоцитарного иммуноглобулиноподобного рецептора (LILRA2); член f семейства, подобного молекуле CD300 (CD300LF); член А семейства 12 доменов лектинов С-типа (CLEC12A); антигена 2 стромальных клеток костного мозга (BST2); белка 2 подобного EGF-подобный модуль-содержащему муцин-подобному рецептору гормонов (EMR2); лимфоцитарного антигена 75 (LY75); глипикана-3 (GPC3); Fc-рецепторо-подобного 5 (FCRL5); и иммуноглобулин лямбда-подобного полипептида 1 (IGLL1), MPL, биотина, с-MYC эпителиального тэга, CD34, LAMP1 TROP2, GFRalpha4, CDH17, CDH6, NYBR1, CDH19,

CD200R, Slea (CA19.9; антиген сиалила Льюиса); Фукозил-GM1, PTK7, gpNMB, CDH1-CD324, DLL3, CD276/B7H3, IL11Ra, IL13Ra2, CD179b-IGL11, ALK TCR гамма-дельта, NKG2D, CD32 (FCGR2A), CSPG4-HMW-MAA, Tim1-/HVFR1, CSF2RA (GMCSFR-альфа), TGFбетаP2, VEGFR2/KDR, Люис антигена, цепи TCR-бета1, цепи TCR-бета2, цепи TCR-гамма, цепи TCR-дельта, FITC, рецептора леутенизирующего гормона (LHR), рецептора фолликулостимулирующего гормона (FSHR), рецептора гормона хорионического гонадотропина (CGHR), CCR4, SLAMF6, SLAMF4, гликопротеина оболочки HIV1, HTLV1-Tax, CMV pp65, EBV-EBNA3c, гемагглютинирина вируса гриппа А (HA), GAD, PDL1, гуанилил циклазы С (GCC), белка KSHV-K8.1, белка KSHV-gH, аутоантитела к десмоглеину 3 (Dsg3), аутоантитела к десмоглеину 1 (Dsg1), HLA, HLA-A, HLA-A2, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA -DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, HLA-G, IgE, CD99, Ras G12V, тканевого фактора 1 (TF1), AFP, GPRC5D, Клаудина18.2 (CLD18A2 или CLDN18A.2), Р- гликопротеина, STEAP1, LIV1, нектин-4, Крипто, gpA33, BST1/CD157, хлоридного канала с низкой проводимостью и антигена, распознаваемого антителом TNT, тем самым подвергая лечению субъекта или предотвращая заболевание у субъекта.

65. Применение или способ по пп. 63 или 64, отличающееся тем, что заболевание, связанное с экспрессией ассоциированного с заболеванием антигена, выбирают из группы, состоящей из пролиферативного заболевания, предракового состояния, рака и состояния, не связанного с раком, но связанного с экспрессией указанного связанного с заболеванием антигена.

66. Применение или способ по п. 65, отличающиеся тем, что рак представляет собой гематологический рак, выбранный из одного или большего количества таких заболеваний как хронический лимфолейкоз (CLL), острые лейкозы, острый лимфолейкоз (ALL), В-клеточный острый лимфолейкоз (B-ALL), Т-клеточный острый лимфолейкоз (T-ALL), хронический миелогенный лейкоз (СML), В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, бластное плазмоцитоидное новообразование дендритных клеток, лимфома Беркитта, диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома, первичная эффузионная лимфома, фолликулярная лимфома, волосатоклеточная лейкемия, мелкоклеточная или крупноклеточная фолликулярная лимфома, злокачественные лимфопролиферативные состояния, MALT лимфома, лимфома мантийных клеток, лимфома маргинальной зоны, множественная миелома, миелодисплазия и миелодиспластический синдром, неходжкинская лимфома, лимфома Ходжкина, плазмобластическая лимфома, плазмоцитоидное новообразование дендритных клеток, макроглобулинемия Вальденстрема или пролейкоз.

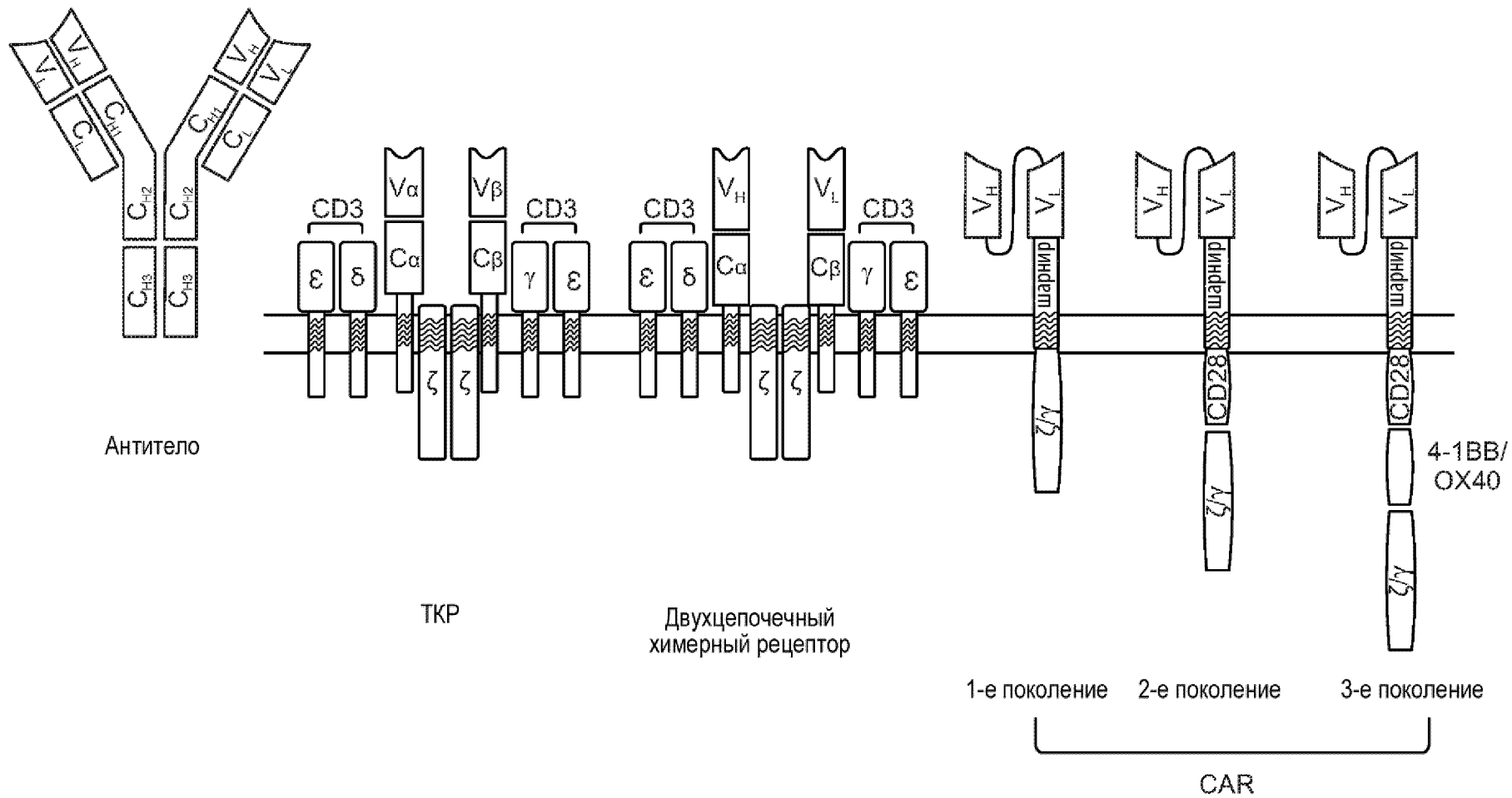
67. Применение или способ по п. 65, отличающиеся тем, что рак выбран из группы, состоящей из рака толстой кишки, рака прямой кишки, почечно-клеточного рака, рака печени, немелкоклеточного рака легкого, рака тонкой кишки, рака пищевода, меланомы, рака костей, рака поджелудочной железы, рака кожи, рака головы или шеи, злокачественной или внутриглазной злокачественной меланомы, рака матки, рака яичников, рака прямой кишки, рака анальной области, рака желудка, рака яичка, рака

матки, рака фаллопиевых труб матки, рака эндометрия, рака шейки матки, рака влагалища, рака вульвы, болезни Ходжкина, неходжкинской лимфомы, рака эндокринной системы, рака щитовидной железы, рака паращитовидной железы, рака надпочечника, саркомы мягких тканей, рака мочеиспускательного канала, рака полового члена, твердых опухолей детского возраста, рака мочевого пузыря, рака почки или мочеточника, рака почечной лоханки, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), первичной лимфомы ЦНС, опухоли ангиогенеза, опухоли оси позвоночника, глиомы ствола головного мозга, аденомы гипофиза, саркомы Капоши, рака Меркеля, рака эпидермоида, плоскоклеточного рака, лимфомы Т-клеток, рака, вызванного окружающей средой, комбинаций указанных видов рака, и метастатических поражений указанных видов рака.

68. Применение или способ по п. 65, отличающиеся тем, что заболевание связано с инфекцией вирусами, включающим, но не ограничивается ими, HIV1, HIV2, HTLV1, вирус Эпштейна-Барра (EBV), цитомегаловирус (CMV), аденовирус, аденоассоциированный вирус, вирус ВК, герпесвирус 6 человека, герпесвирус 8 человека, вирус гриппа, вирус парагриппа, вирус птичьего гриппа, коронавирусы MERS и SARS, вирус Конго-Крымской геморрагической лихорадки, рино вирус, энтеровирус, вирус Денге, вирус Западного Нила, вирус Эбола, вирус Марбург, вирус лихорадки Ласса, Зика вирус, RSV, вирус кори, вирус паротита, риновирус, вирус ветряной оспы, вирус простого герпеса 1 и 2, вирус ветряной оспы, HIV-1, HTLV1, вирус гепатита, энтеровирус, вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирусы лихорадки Нипах и долины Рифт, вирус японского энцефалита, микобактерии туберкулеза, атипичные виды микобактерий, *Pneumocystis jirovecii*, токсоплазмозма, риккетсия, нокардия, аспергиллюс, мукор или кандиды.

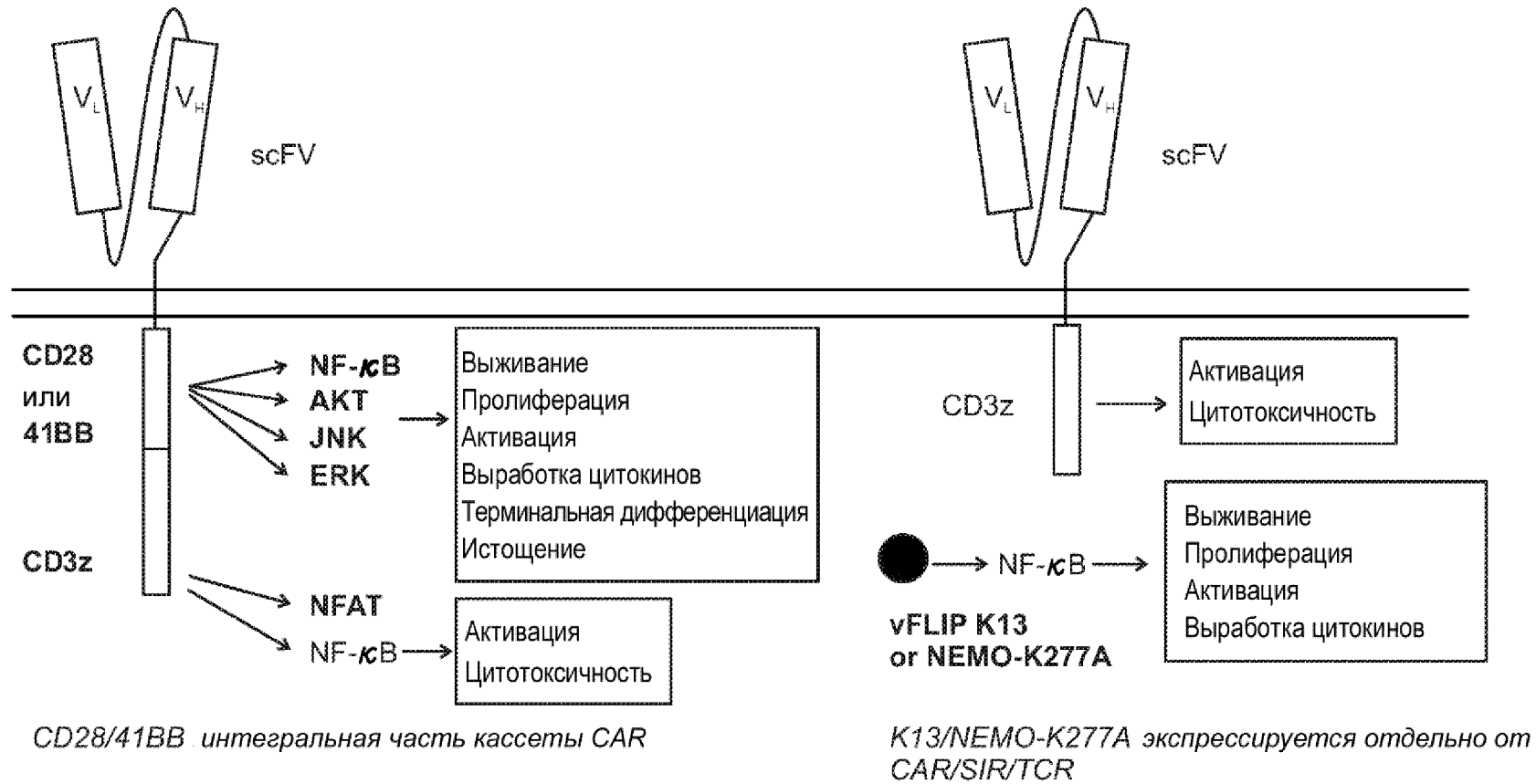
69. Применение или способ по п. 65, отличающиеся тем, что заболевание представляет собой иммунное или дегенеративное заболевание, включая, но не ограничиваясь ими, сахарный диабет, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, пузырчатку обыкновенную, анкилозирующий спондилит, тиреоидит Хошимото, СКВ, саркоидоз, склеродермию, заболевание смешанной соединительной ткани, трансплантат против хозяина или болезнь Альцгеймера.

По доверенности

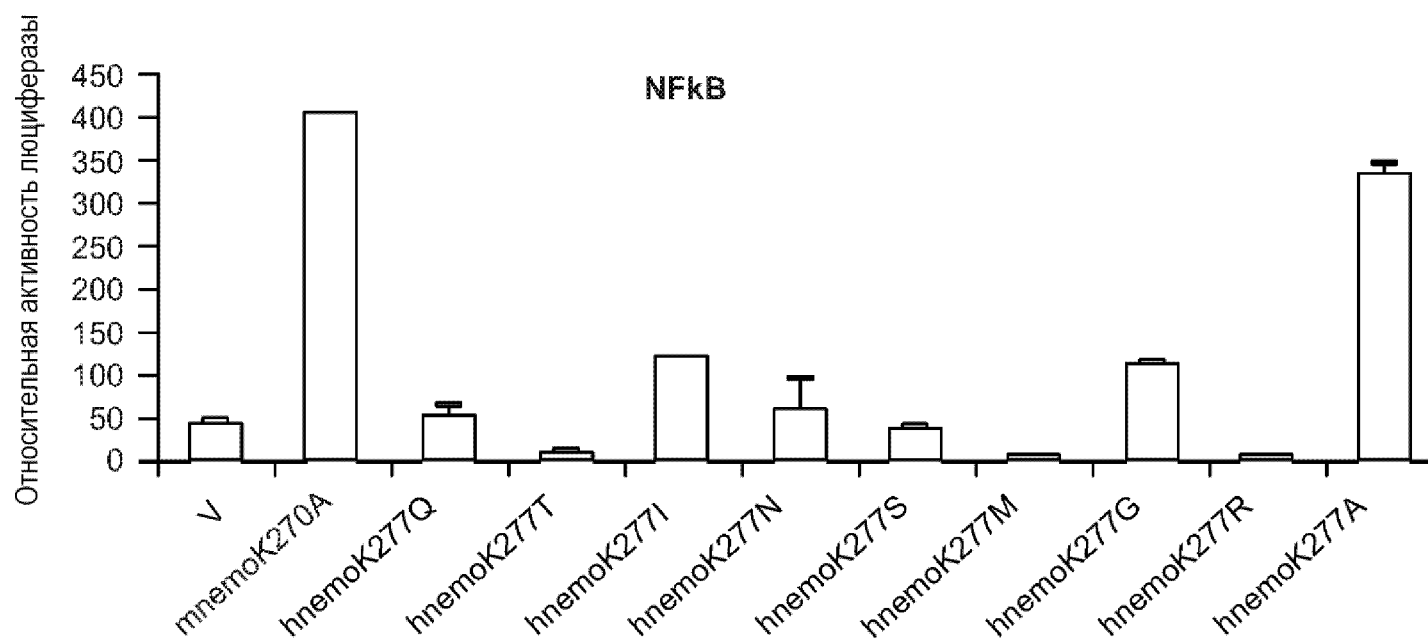


Фиг. 1

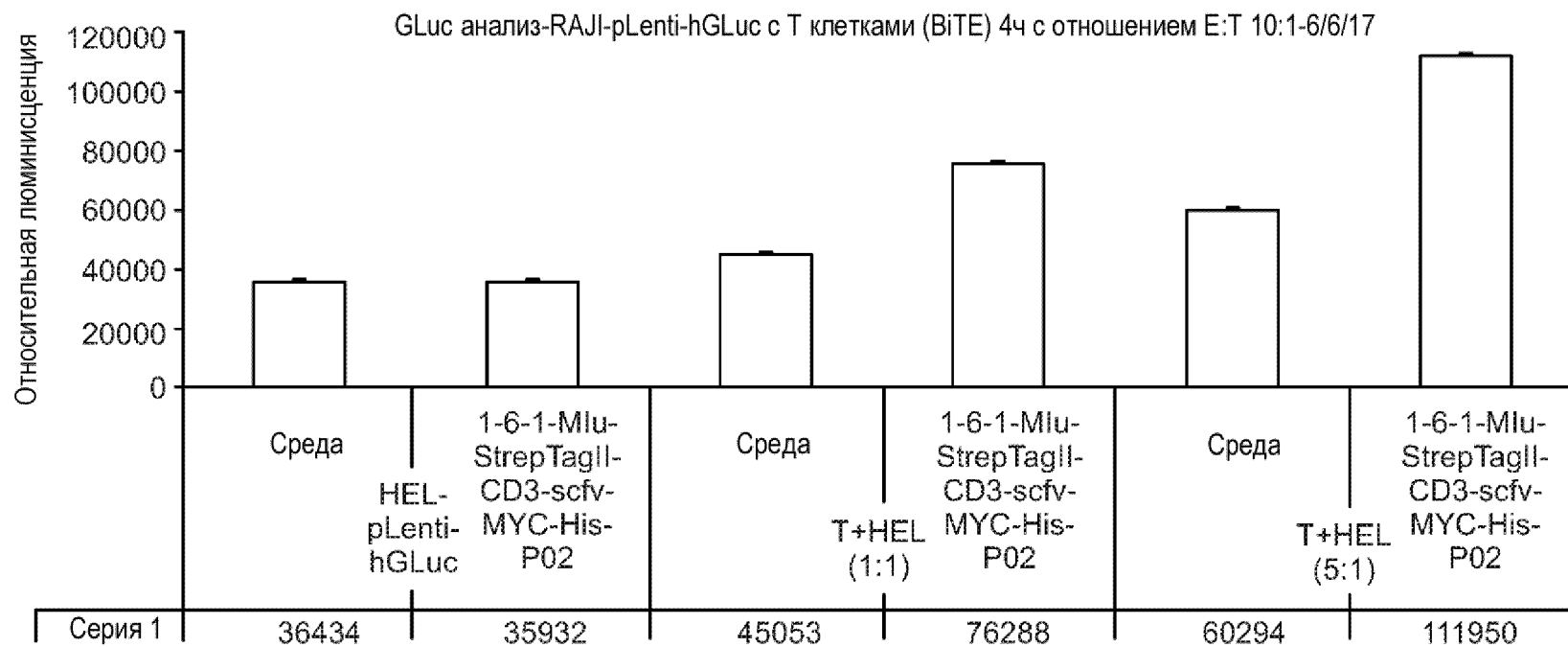
2-е поколение CAR



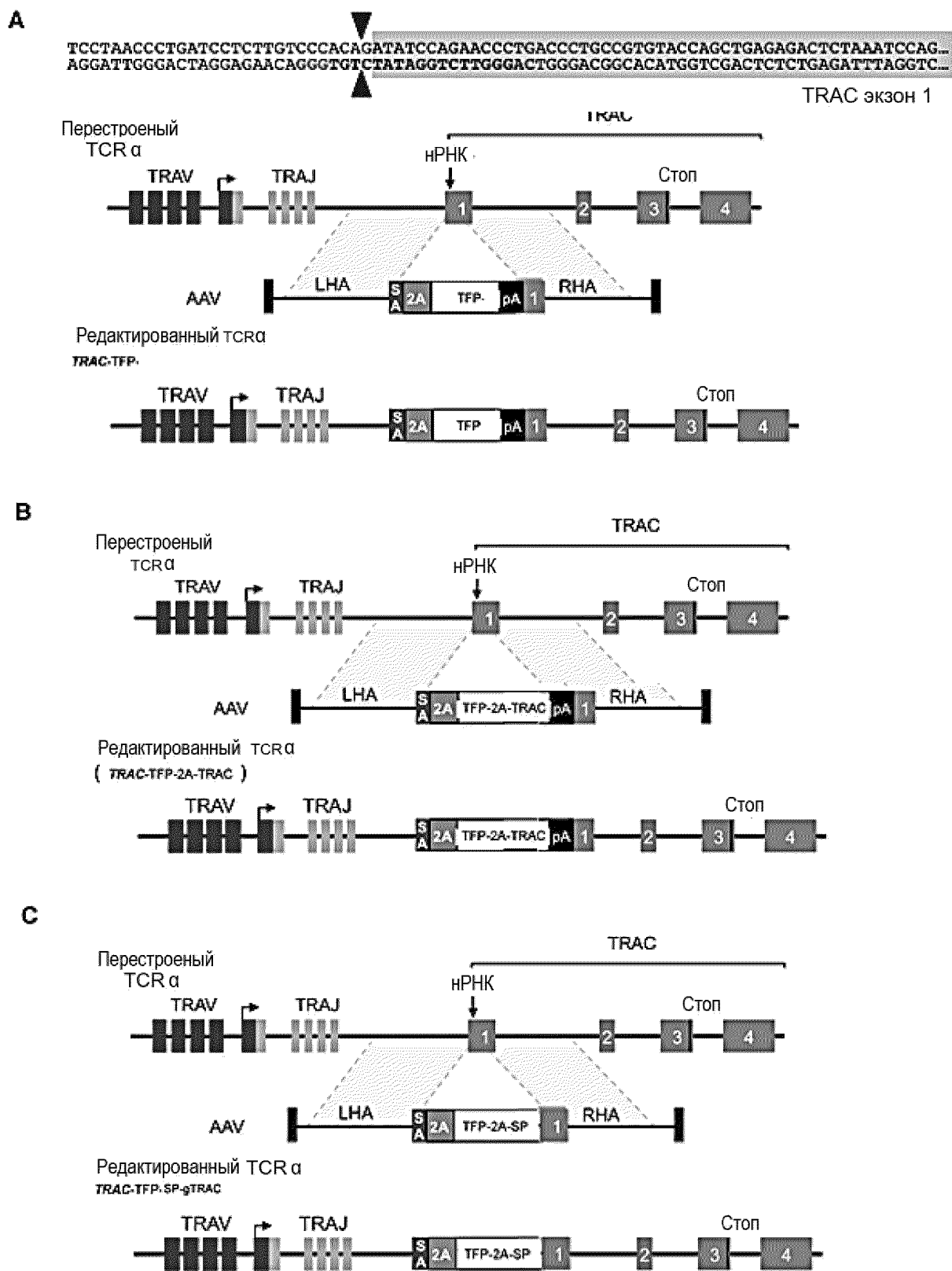
Фиг. 2



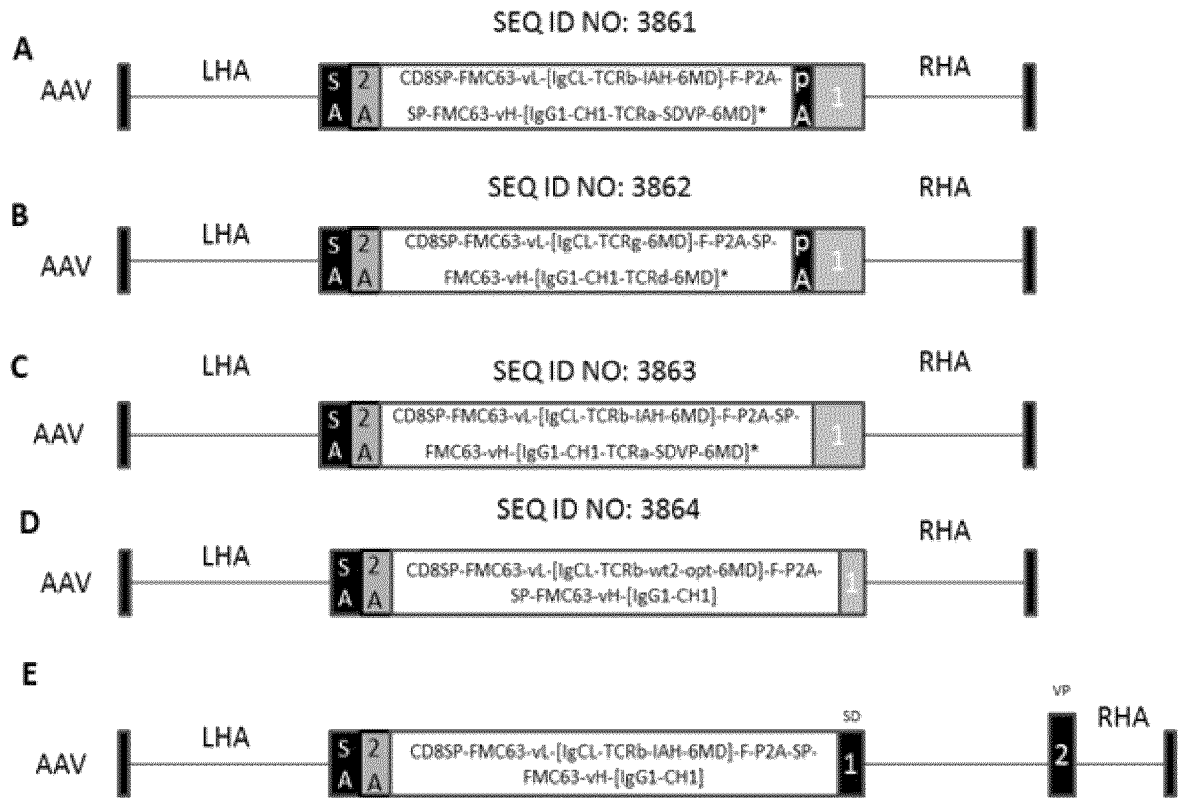
Фиг. 3



Фиг. 4

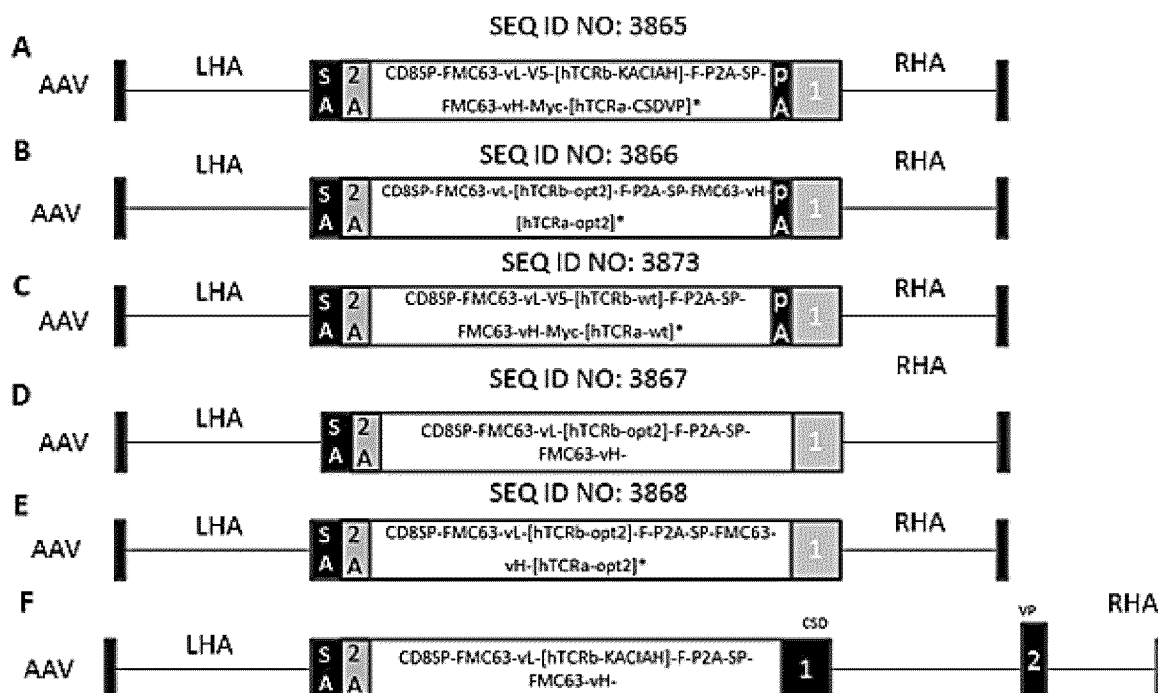


Фиг. 5А-С



*Указывает на СТОП кодон

Фиг. 6А-Е



*Указывает на СТОП кодон

Фиг. 7А-F



*Указывает на СТОП кодон

Фиг. 8А-Д



*Указывает на СТОП кодон

Фиг. 9A-D