

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040586**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.06.29

(21) Номер заявки
201891992

(22) Дата подачи заявки
2017.03.31

(51) Int. Cl. **A61K 31/7068** (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

(54) ХИМЕРНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **62/317,068**

(32) **2016.04.01**

(33) **US**

(43) **2019.08.30**

(86) **PCT/US2017/025573**

(87) **WO 2017/173384 2017.10.05**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КАЙТ ФАРМА, ИНК.; АМГЕН ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
Вилтзиус Джед, Альварес Родригес
Рубен, Баккер Элис, Арведсон Тара,
Ву Лоурен (US)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) **WO-A2-2005000894**

LU et al.: "Targeting Human C-Type Lectin-like Molecule-1 (CLL1) with a Bispecific Antibody for Immunotherapy of Acute Myeloid Leukemia", *Angew Chem Int Ed Engl*, 08 September 2014 (08.09.2014), vol. 53, iss. 37, pgs. 9841-9845, entire document

US-A1-20160051651

ZHAO et al.: "Targeting C-type lectin-like molecule-1 for antibody-mediated immunotherapy in acute myeloid leukemia", *Haematologica*, 31 July 2009 (31.07.2009), vol. 95, pgs. 71-78, entire document

WO-A2-2015142675

TASHIRO et al.: "Treatment of Acute Myeloid Leukemia with T Cells Expressing Chimeric Antigen Receptors Directed to C-type Lectin-like Molecule 1", *Molecular Therapy*, 01 July 2017 (01.07.2017), entire document

(57) Согласно настоящему изобретению предложены антигенсвязывающие молекулы, химерные рецепторы и сконструированные иммунные клетки. Настоящее изобретение также относится к векторам, композициям и способам лечения и/или детектирования с применением антигенсвязывающих молекул и сконструированных иммунных клеток.

040586

B1

040586

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка представляет собой продолжающуюся заявку на основе заявки на патент США № 15/476699, поданной 31 марта 2017 г., и испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/317068, поданной 1 апреля 2016 г., полное содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

Ссылка на перечень последовательностей, поданный электронно

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII, и его полное содержание включено в настоящее описание посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 19 ноября 2019 г., названа K-1029_02US_SL.txt и имеет размер 274746 байт.

Уровень техники

Лектиноподобный белок 1 С-типа (CLL-1, также известный как CLEC-1, CLEC12A, MICL, ассоциированный с дендритными клетками лектин 1 (DCAL-1) и (DCAL-2), представляет собой гликопротеиновый рецептор и является членом семейства лектиноподобных рецепторов С-типа, участвующих в регуляции клеточной пролиферации и иммунной регуляции. CLL-1 экспрессируется в гемопоэтических клетках, прежде всего в клетках, обеспечивающих врожденный иммунитет, включая моноциты, гранулоциты, дендритные клетки, а также миелоидные клетки-предшественники (см. Van Rhenen et al., Blood, 2007, 110 (7)). CLL-1 участвует в регуляции пролиферации и дифференцировки миелоидных клеток (Bakker et al., Cancer Res., 64:8443-8450 (2004); Marshall et al., J. Biol. Chem., 279:14792-14802 (2004)) и присутствует на клетках острого миелоидного (миелогенного) лейкоза (ОМЛ), а также на лейкозных стволовых клетках (Zhao et al., Haematologica, 2010, 95(1):71-78).

Соответственно CLL-1 участвует в развитии многих заболеваний, включающих, но не ограничивающихся перечисленными, острый миелоидный (миелогенный) лейкоз (ОМЛ), хронический миелоидный (миелогенный) лейкоз (ХМЛ), хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММЛ), ювенильный миеломоноцитарный лейкоз, атипичный хронический миелоидный лейкоз, острый промиелоцитарный лейкоз (ОПЛ), острый моноцитарный лейкоз, острый монобластный лейкоз, острый эритроидный лейкоз, острый мегакариобластный лейкоз, миелодиспластический синдром (МДС), миелопролиферативное заболевание, миелоидное новообразование, миелоидную саркому, бластическое плазмитоидное дендритное клеточное новообразование (BPDCN) или их комбинации.

CLL-1 может дополнительно играть роль в воспалительных или аутоиммунных заболеваниях, таких как ревматоидный артрит, псориаз, аллергия, астма, болезнь Крона, воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), синдром раздраженного кишечника (СРК), фибромиалгия, мастоцитоз и целиакия.

Белок CLL-1 человека содержит полипептид со следующей аминокислотной последовательностью:

```
MSEEVTYADLQFQNSSEMEKIPKIFGKFKAPPAPSHVWRPAALFLTLCLL
LLIGLGVLASMFHVTLKIEKMKMNLQNISEELQRNLSLQMSNMNISKIR
NLSTTLQTIATKLCRELYSKEQENKCKPCPRRWIWNKDCYFLSDDVQTWQ
ESKMACAAQNASLLKINNKNALEFIKSQRSYDYWLGLSPEEDSTRGMRVD
NINSSAWVIRNAPDLNMYCGYINRLYVQYYHCTYKRMICEKMANPVQ
LGSTYFREA (SEQ ID NO. 140).
```

Дополнительная информация о последовательности содержится в перечне базы данных Uniprot для CLL-1, доступном по ссылке: www.uniprot.org/uniprot/Q5QGZ9, а также в эталонной последовательности NP_612210.4 в базе данных NCBI, доступной по ссылке: www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_612210.4.

При упоминании CLL-1 следует понимать, что ссылки на него включают его фрагменты, а также родственные полипептиды, которые включают, но не ограничиваются перечисленными, аллельные варианты, сплайс-варианты, варианты производных, варианты, полученные путем замен, варианты, полученные путем делеций, и/или варианты, полученные путем инсерций, включая добавление N-концевого метионина, слитые полипептиды и межвидовые гомологи. В некоторых вариантах реализации полипептид CLL-1 содержит концевые остатки, такие как, но не ограничивающиеся перечисленными, остатки лидерной последовательности, остатки, предназначенные для нацеливания, N-концевые остатки метионина, остатки лизина, остатки меток и/или остатки слитых белков.

Некоторые антитела против CLL-1 описаны в патенте США № 8536310 и в патенте США № 9163090.

Было показано, что сконструированные иммунные клетки обладают желаемыми качествами для терапевтических способов лечения, в частности для применения в онкологии. Два основных типа сконструированных иммунных клеток представляют собой клетки, содержащие химерные антигенные рецепторы (называемые "CAR" или "CAR-T") и Т-клеточные рецепторы ("TCR"). Эти сконструированные клетки сконструированы таким образом, чтобы обладать специфичностью к антигену с сохранением или усилением их способности распознавать и уничтожать клетку-мишень. Химерные антигенные рецепторы могут содержать, например,

- (i) антигенспецифичный компонент ("антигенсвязывающую молекулу");
- (ii) внеклеточный домен;

- (iii) один или более костимулирующих доменов; и
- (iv) один или более доменов активации.

Каждый домен может быть гетерогенным, т.е. состоящим из последовательностей, полученных из (или соответствующих) разных белковых цепей. Экспрессирующие химерные антигенные рецепторы иммунные клетки (клетки иммунной системы) (такие как Т-клетки) могут применяться в различных видах терапии, включая терапию рака. Следует понимать, что костимулирующие домены могут применяться для усиления активации экспрессирующих CAR клеток против антигенов-мишеней и, следовательно, для увеличения эффективности адаптивной иммунотерапии.

Некоторые CAR против CLL-1 были описаны, например, в заявке на патент США 20160051651 (PCT US2015/041337).

Т-клетки могут быть сконструированы таким образом, чтобы обладать специфичностью к одной или более желаемым мишеням. Например, Т-клетки могут быть трансдуцированы с применением ДНК или другого генетического материала, кодирующего антигенсвязывающую молекулу, такую как один или более одноцепочечных вариабельных фрагментов ("scFv") антитела, в сочетании с одной или более сигнальными молекулами и/или одним или более доменами активации, такими как CD3 дзета.

В дополнение к способности экспрессирующих CAR Т-клеток распознавать и разрушать клетки-мишени успех Т-клеточной терапии обеспечивается за счет способности экспрессирующих CAR Т-клеток сохранять и поддерживать способность к пролиферации в ответ на взаимодействие с антигеном.

Т-клеточные рецепторы (TCR) представляют собой молекулы, обнаруженные на поверхности Т-клеток, которые ответственны за распознавание фрагментов антигена, таких как пептиды, связанные с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС). TCR состоит из двух различных белковых цепей; приблизительно 95% TCR человека состоят из альфа (α) и бета (β) цепи. В случае приблизительно 5% Т-клеток человека TCR состоит из гамма и дельта (γ/δ) цепей. Каждая цепь состоит из двух внеклеточных доменов: вариабельной (V) области и константного (C) участка, каждый из которых относится к суперсемейству иммуноглобулинов. Как и в других иммуноглобулинах, каждый из вариабельных доменов α -цепи и β -цепи TCR (или гамма и дельта (γ/δ) цепей) содержит три гипервариабельных участка или участка, определяющих комплементарность (CDR). Когда TCR взаимодействует с антигенным пептидом и МНС (комплексом пептид/МНС), Т-клетка активируется, что позволяет ей атаковать и разрушать клетку-мишень.

Однако было показано, что современные способы терапии имеют различные уровни эффективности и демонстрируют нежелательные побочные эффекты. В связи с этим существует потребность в выявлении новых и улучшенных способов терапии для лечения заболеваний и расстройств, связанных с CLL-1.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к сконструированным иммунным клеткам (таким как CAR или TCR), к антигенсвязывающим молекулам (включающим, но не ограничивающимся перечисленными, антитела, scFv, тяжелые и/или легкие цепи и CDR этих антигенсвязывающих молекул), имеющим специфичность к CLL-1.

Настоящее изобретение также относится к новой последовательности внеклеточного (шарнирного) участка CD28, подходящего в качестве костимулирующих доменов в этих клетках.

Химерные антигенные рецепторы согласно настоящему изобретению, как правило, содержат

- (i) специфичную антигенсвязывающую молекулу против CLL-1;
- (ii) внеклеточный домен (который может содержать шарнирный домен);
- (iii) один или более костимулирующих доменов; и
- (iv) один или более доменов активации.

Следует понимать, что каждый домен может быть гетерогенным, т.е. состоящим из последовательностей, полученных из (или соответствующих) различных белковых цепей.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к химерному антигенному рецептору, содержащему антигенсвязывающую молекулу, которая специфично связывается с CLL-1, при этом указанная антигенсвязывающая молекула содержит по меньшей мере один из

- a) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 51, 73 и 95;
- b) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 52, 74 и 96;
- c) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, 53, 75 и 97;
- d) CDR1 вариабельной области легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 56, 78 и 100;
- e) CDR2 вариабельной области легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 57, 79 и 101; и
- f) CDR3 вариабельной области легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 58, 80 и 102.

Химерный антигенный рецептор может дополнительно содержать по меньшей мере один костимулирующий домен. Также изобретение относится к химерному антигенному рецептору по п.1, дополнительно содержащему по меньшей мере один домен активации.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к химерным антигенным рецепторам, которые на по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или 100% идентичны химерным антигенным рецепторам, представленным в настоящем описании.

Настоящее изобретение также относится к химерным антигенным рецепторам, содержащим не более 8 аминокислотных замен.

В некоторых вариантах реализации костимулирующий домен содержит сигнальный домен (или другой подходящий участок) CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, белка 1 программируемой смерти (PD-1), индуцибельного костимулятора Т-клеток (ICOS), ассоциированного с функцией лимфоцитов антигена-1 (LFA-1, CD1-la/CD18), CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig альфа (CD79a), DAP-10, Fc-рецептора гамма, молекулы МНС класса I, белков-рецепторов ФНО, белка иммуноглобулина, рецептора цитокина, интегринов, сигнальных молекул активации лимфоцитов (белков SLAM), активирующих рецепторов NK-клеток, BTLA, рецептора Toll лиганда, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8 альфа, CD8 бета, IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD1 ld, ITGAE, CD103, ITGAL, CD1 la, LFA-1, ITGAM, CD1 lb, ITGAX, CD1 lc, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, лиганда, специфично связывающегося с CD83, или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах реализации костимулирующий домен может содержать полностью или частично нуклеотидную последовательность 4-1BB, представляющую собой SEQ ID NO: 141, и соответствующую аминокислотную последовательность, представляющую собой SEQ ID NO: 142. В других вариантах реализации костимулирующий домен может содержать полностью или частично аминокислотную последовательность OX40, представляющую собой SEQ ID NO: 143. См. также Hombach et al., *Oncimmunology*, 2012 Jul. 1, 1(4):458-466. В других вариантах реализации костимулирующий домен может содержать целую молекулу ICOS или ее участок, как описано в Guedan et al., August 14, 2014; *Blood*: 124 (7); и Shen et al., *Journal of Hematology & Oncology* (2013), 6:33. В других вариантах реализации костимулирующий домен может содержать целую молекулу или участок CD27, как описано в Song et al., *Oncimmunology*, 2012 Jul. 1, 1(4):547-549.

Предпочтительные варианты реализации включают введение в CAR согласно настоящему изобретению одной или более из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 8. Дополнительные предпочтительные варианты реализации включают введение в CAR согласно настоящему изобретению последовательности, представляющей собой SEQ ID NO: 14.

В других вариантах реализации домен активации содержит CD3, предпочтительно CD3 дзета, более предпочтительно CD3 дзета, содержащий последовательность, представляющую собой SEQ ID NO: 10.

В других вариантах реализации настоящее изобретение относится к химерному антигенному рецептору, содержащему антигенсвязывающую молекулу, дополнительно содержащую SEQ ID NO: 2 и дополнительно содержащую SEQ ID NO: 10.

Настоящее изобретение также относится к выделенным полинуклеотидам, кодирующим химерные антигенные рецепторы, и к векторам, содержащим указанные полинуклеотиды. Любой вектор, известный в данной области техники, может подходить для настоящего изобретения. В некоторых вариантах реализации вектор представляет собой вирусный вектор. В некоторых вариантах реализации вектор представляет собой ретровирусный вектор (такой как рMSVG1), ДНК-вектор, вектор на основе вируса лейкоза мышей, SFG-вектор, плазмиду, РНК-вектор, аденовирусный вектор, бакуловирусный вектор, вектор на основе вируса Эпштейна-Барр, паповавирусный вектор, вектор на основе вируса осповакцины, вектор на основе вируса простого герпеса, аденоассоциированный вирусный вектор (AAV), лентивирусный вектор (такой как рGAR) или любую их комбинацию. Последовательность рGAR является следующей:

```
CTGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGG
TTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCCGCTCCTT
CGCTTTCTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTCCCGTCAAGCTC
TAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGA
```

CCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGA
TAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACT
CTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATT
TATAAGGGATTTTGCCGATTTCCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTA
ACAAAAATTTAACGCGAATTTTAAACAAAAATATTAACGCTTACAATTTGCCAT
TCGCCATTAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTT
CGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTT
GGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAACGACGCGCCAGTG
AATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGACCCGGGGATGGCGCGCCAGTAAT
CAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATA
ACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTG
ACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATT
GACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCA
AGTGATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGG
CCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGC
AGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGCTGATGCGGTTTTGGCA
GTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTC
CACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACT
TTCCAAAATGTGCTAACAACTCCGCCCATGACGCAAATGGGCGGTAGGC
GTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGGGGTC
TCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAAC
CCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTG
CCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTC
AGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAA
GGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGC
ACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGGGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTGACT
AGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCG
GGGAGAAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAA
AGAAAAAATATAAATTTAAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAA
CGATTTCGAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAAACATCAGAAGGCTGTAGACAA
ATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGA
TCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGA
TAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAAACAAA

AGTAAGACCACCGCACAGCAAGCCGCCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGG
AGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAA
AATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCA
GAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCCTTGGGTTCTTGGG
AGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGC
CAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCT
ATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAG
CTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTC
CTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACCTATTTGCACCACTGCTGTGCCTT
GGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGA
CCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACT
CCTTAATTGAAGAATCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTAT
TGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAACATAACAAATTG
GCTGTGGTATATAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTA
AGAATAGTTTTTGTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATT
CACCATATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCGAGGGGACCCGACAGGCC
CGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTC
GATTAGTGAACGGATCTCGACGGTATCGGTTAACTTTTAAAAGAAAAGGGG
GGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACA
GACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAATTCAAAATTTTA
TCGCGATCGCGGAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTA
AGTAACGCCATTTTGAAGGCATGGAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAG
TTCAGATCAAGGTTAGGAACAGAGAGACAGCAGAATATGGGCCAAACAGG
ATATCTGTGGTAAGCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGT
CCCCAGATGCGGTCCC GCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTC
CAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCA
ATCAGTTTCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAA
AAGAGCCCACAACCCCTCACTCGGCGGCCAGTCCTTCGAAGTAGATCTTTG
TCGATCCTACCATCCACTCGACACACCCGCCAGCGGCCGCTGCCAAGCTTCC
GAGCTCTCGAATTAATTCACGGTACCCACCATGGCCTAGGGAGACTAGTCG
AATCGATATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTC
TTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTG
TATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTCTCCTCCTTGTATAAATCC

TGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCG
TGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCACTGGTTGGGGCATTGCCAC
CACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGG
CGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTT
GGGCACTGACAAATCCGTGGTGTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTTCATGG
CTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGT
CCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCTGCTGCCGGCT
CTGCGGCCCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCT
TTGGGCCGCTCCCCGCTGGTTAATTAAGTACCTTTAAGACCAATGACTT
ACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGG
AAGGGCGAATCACTCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGG
GTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGG
AACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCCTTGAGTGCTCAAGTAGTGT
GTGCCCCTGCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTA
GTCAGTGTGAAAAATCTCTAGCAGGCATGCCAGACATGATAAGATACATTG
ATGAGTTTGGACAAAACCACAAC TAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTT
GTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAA
ACAAGTTAAACAACAACAAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTACAGGGGGAG
GTGTGGGAGGTTTTTTGGCGGCCATCGTCGAGGTTCCCTTTAGTGAGGGTT
AATTGCGAGCTTGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCGTGTGAAATTGT
TATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTA
GCCTGGGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCAC
TGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGG
CCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCG
CTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTC
ACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAA
AGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCC
GCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAA
ATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACC
AGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCC
GCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTC
ATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCT
GGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGT

AACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAG
 CAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGTACAG
 AGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGG
 TATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCT
 TGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGC
 AGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTT
 CTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGG
 TCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATG
 AAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTAC
 CAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTGTTTCATC
 CATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTA
 CCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTC
 CAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTG
 GTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCT
 AGAGTAAGTAGTTCCGAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTA
 CAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTTCAGCTCCGG
 TTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGC
 GGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAAGTTGGCCGCAAGT
 TTACTACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTTCTTACTGTCATGCCATC
 CGTAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAA
 TAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAATA
 CCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTC
 GGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAA
 CCCACTCGTGACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTC
 TGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGG
 CGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAG
 CATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGATTTAG
 AAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

Карта вектора pGAR представлена на фиг. 11.

Подходящие дополнительные типовые векторы включают, например, pBABE-puro, pBABE-neo largeTcDNA, pBABE-hygro-hTERT, pMKO.1 GFP, MSCV-IRES-GFP, pMSCV PIG (пустая плазмида Puro IRES GFP), pMSCV-loxp-dsRed-loxp-eGFP-Puro-WPRE, MSCV IRES Luciferase, pMIG, MDH1-PGK-GFP2.0, TrRMPVIR, pMSCV-IRES-mCherry FP, pRetroX GFP T2A Cre, pRXTN, pLncEXP и pLXIN-Luc.

Типовые иммунные клетки включают, но не ограничиваются перечисленными, Т-клетки, лимфоциты, инфильтрующие опухоль (TIL), NK-клетки, экспрессирующие TCR клетки, дендритные клетки или NK-Т-клетки. Т-клетки могут быть аутологичными, аллогенными или гетерологичными. В других вариантах реализации настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим иммунные клетки согласно настоящему описанию.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам (и химерным антигенным рецепторам, содержащим эти молекулы), содержащим по меньшей мере один из

- (a) области VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и области VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21;
- (b) области VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, и области VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55;
- (c) области VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72, и области VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77;
- (d) области VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94, и области VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99,

где область или области VH и VL связаны с помощью по меньшей мере одного линкера.

Настоящее изобретение также относится к химерным антигенным рецепторам и/или антигенсвязывающим молекулам, содержащим не более 8 аминокислотных замен.

Линкер может представлять собой, например, полиглициновый линкер, такой как GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 130) или GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 145).

В других вариантах реализации настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам (и химерным антигенным рецепторам, содержащим эти молекулы), где линкер содержит по меньшей мере одну из последовательностей SEQ ID NO: 130 и SEQ ID NO: 132.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам и/или химерным антигенным рецепторам, которые на по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или 100% идентичны антигенсвязывающим молекулам и/или химерным антигенным рецепторам, представленным в настоящем описании.

В других вариантах реализации настоящее изобретение относится к выделенным полинуклеотидам, содержащим по меньшей мере одну из последовательностей SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 47; SEQ ID NO: 61; SEQ ID NO: 65; SEQ ID NO: 69; SEQ ID NO: 83; SEQ ID NO: 87; SEQ ID NO: 91; SEQ ID NO: 105; SEQ ID NO: 109; SEQ ID NO: 113; SEQ ID NO: 117; SEQ ID NO: 121; и SEQ ID NO: 125.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к выделенным полинуклеотидам, которые на по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или 100% идентичны полинуклеотидам, представленным в настоящем описании.

Настоящее изобретение также относится к векторам, содержащим эти полинуклеотиды, а также к клеткам, трансдуцированным с применением этих векторов.

В других вариантах реализации настоящее изобретение относится к выделенным полипептидам, содержащим аминокислотную последовательность, представляющую собой по меньшей мере одну из SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 48; SEQ ID NO: 62; SEQ ID NO: 66; SEQ ID NO: 70; SEQ ID NO: 84; SEQ ID NO: 88; SEQ ID NO: 92; SEQ ID NO: 106; SEQ ID NO: 110; SEQ ID NO: 114; SEQ ID NO: 118; SEQ ID NO: 122; и SEQ ID NO: 126. В других вариантах реализации настоящее изобретение относится к векторам, кодирующим эти полипептиды, к иммунным клеткам, содержащим эти полипептиды. Предпочтительные иммунные клетки включают Т-клетки, лимфоциты, инфильтрующие опухоль (TIL), НК-клетки, экспрессирующие TCR клетки, дендритные клетки или НК-Т-клетки. Т-клетки могут быть аутологичными, аллогенными или гетерологичными. Настоящее изобретение также относится к химерным антигенным рецепторам, содержащим не более 8 аминокислотных замен.

В других вариантах реализации настоящее изобретение относится к выделенным полинуклеотидам, кодирующим химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR), содержащий антигенсвязывающую молекулу, которая специфично связывается с CLL-1, при этом указанная антигенсвязывающая молекула содержит CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (V_H), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, 53, 75 и 97. Настоящее изобретение также относится к химерным антигенным рецепторам, содержащим не более 8 аминокислотных замен. Указанные полинуклеотиды могут дополнительно содержать домен активации. В предпочтительных вариантах реализации домен активации представляет собой CD3, более предпочтительно CD3 дзета, более предпочтительно аминокислотную последовательность, представляющую собой SEQ ID NO: 9.

В других вариантах реализации настоящее изобретение включает костимулирующий домен, содержащий сигнальный домен (или другой подходящий участок) CD28, CD28T, OX40, 4-1BB/CD137, CD2, CD3 (альфа, бета, дельта, эпсилон, гамма, дзета), CD4, CD5, CD7, CD9, CD16, CD22, CD27, CD30, CD33, CD37, CD40, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, PD-1, ICOS, ассоциированного с функцией лимфоцитов антигена-1 (LFA-1 (CD11a/CD18), CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT (члена 14 суперсемейства фактора некроза опухолей; TNFSF14), NKG2C, Ig альфа (CD79a), DAP-10, Fc-рецептора гамма, молекулы MHC класса I, ФНО, TNF α , интегрин, сигнальной молекулы активации лимфоцитов, BTLA, рецептора Toll лиганда, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRP1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8 альфа, CD8 бета, IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDI-Id, ITGAE, CD103, ITGAL, CDI-1a, LFA-1, ITGAM, CDI-1b, ITGAX, CDI-1c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, лиганда CD83 или их фрагменты или комбинации. Предпочтительные костимулирующие домены перечислены ниже в тексте настоящего описания.

В других вариантах реализации настоящее изобретение относится к выделенным полинуклеотидам,

кодирующим химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR), содержащий антигенсвязывающую молекулу, которая специфично связывается с CLL-1, при этом указанная антигенсвязывающая молекула содержит CDR3 вариабельной области легкой цепи (V_L), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 58, 80 и 102. Указанный полинуклеотид может дополнительно содержать домен активации. Указанный полинуклеотид может дополнительно содержать костимулирующий домен.

В других вариантах реализации настоящее изобретение относится к выделенным полинуклеотидам, кодирующим химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR), содержащий антигенсвязывающую молекулу, которая специфично связывается с CLL-1, при этом тяжелая цепь указанной антигенсвязывающей молекулы содержит CDR1 (SEQ ID NO: 17), CDR2 (SEQ ID NO: 18) и CDR3 (SEQ ID NO: 19), а легкая цепь указанной антигенсвязывающей молекулы содержит CDR1 (SEQ ID NO: 22), CDR2 (SEQ ID NO: 23) и CDR3 (SEQ ID NO: 24).

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к выделенным полинуклеотидам, которые на по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или 100% идентичны описанным выше последовательностям.

В других вариантах реализации настоящее изобретение относится к выделенным полинуклеотидам, кодирующим химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR), содержащий антигенсвязывающую молекулу, которая специфично связывается с CLL-1, при этом тяжелая цепь указанной антигенсвязывающей молекулы содержит CDR1 (SEQ ID NO: 51), CDR2 (SEQ ID NO: 52) и CDR3 (SEQ ID NO: 53), а легкая цепь указанной антигенсвязывающей молекулы содержит CDR1 (SEQ ID NO: 56), CDR2 (SEQ ID NO: 57) и CDR3 (SEQ ID NO: 58).

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к выделенным полинуклеотидам, которые на по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или 100% идентичны описанным выше последовательностям.

В других вариантах реализации настоящее изобретение относится к выделенным полинуклеотидам, кодирующим химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR), содержащий антигенсвязывающую молекулу, которая специфично связывается с CLL-1, при этом тяжелая цепь указанной антигенсвязывающей молекулы содержит CDR1 (SEQ ID NO: 73), CDR2 (SEQ ID NO: 74) и CDR3 (SEQ ID NO: 75), а легкая цепь указанной антигенсвязывающей молекулы содержит CDR1 (SEQ ID NO: 78), CDR2 (SEQ ID NO: 79) и CDR3 (SEQ ID NO: 80).

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к выделенным полинуклеотидам, которые на по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или 100% идентичны описанным выше последовательностям.

В других вариантах реализации настоящее изобретение относится к выделенным полинуклеотидам, кодирующим химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR), содержащий антигенсвязывающую молекулу, которая специфично связывается с CLL-1, при этом тяжелая цепь указанной антигенсвязывающей молекулы содержит CDR1 (SEQ ID NO: 95), CDR2 (SEQ ID NO: 96) и CDR3 (SEQ ID NO: 97), а легкая цепь указанной антигенсвязывающей молекулы содержит CDR1 (SEQ ID NO: 100), CDR2 (SEQ ID NO: 101) и CDR3 (SEQ ID NO: 102).

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к выделенным полинуклеотидам, которые на по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или 100% идентичны описанным выше последовательностям.

В других вариантах реализации настоящее изобретение относится к выделенным полинуклеотидам, кодирующим химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR), содержащий антигенсвязывающую молекулу, которая специфично связывается с CLL-1, при этом указанная антигенсвязывающая молекула содержит

(а) участок, определяющий комплементарность (CDR), 1 вариабельной области тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность $GX_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ (SEQ ID NO: 134), где

X_2 представляет собой G, F или Y;

X_3 представляет собой S или T;

X₄ представляет собой I, F или L;
 X₅ представляет собой S или T;
 X₆ отсутствует или представляет собой S;
 X₇ отсутствует или представляет собой G;
 X₈ отсутствует или представляет собой E или G; и
 X₉ представляет собой F, L или Y;

(b) участок, определяющий комплементарность (CDR), 2 варибельной области тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность X₁X₂X₃X₄X₅X₆ (SEQ ID NO: 135), где

X₁ представляет собой D, H, S или Y;
 X₂ представляет собой H, P или Y;
 X₃ представляет собой D, E или S;
 X₄ представляет собой D или G;
 X₅ представляет собой G или S; и
 X₆ отсутствует или представляет собой D или E;

(c) участок, определяющий комплементарность (CDR), 3 варибельной области тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂DY (SEQ ID NO: 136), где

X₁ представляет собой E или L;
 X₂ представляет собой R, S или V;
 X₃ представляет собой R или Y;
 X₄ представляет собой C, G или S;
 X₅ отсутствует или представляет собой G или I;
 X₆ отсутствует или представляет собой G;
 X₇ отсутствует или представляет собой D;
 X₈ отсутствует или представляет собой C;
 X₉ отсутствует или представляет собой W или Y;
 X₁₀ отсутствует или представляет собой P или S;
 X₁₁ отсутствует или представляет собой G или Y; и
 X₁₂ представляет собой F или R;

(d) CDR1 варибельной области легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность X₁ASQX₅X₆X₇X₈X₉LX₁₁ (SEQ ID NO: 137), где

X₁ представляет собой Q или R;
 X₅ представляет собой D или S;
 X₆ представляет собой I или V;
 X₇ представляет собой N или S;
 X₈ представляет собой N или S;
 X₉ представляет собой F, L или Y; и
 X₁₁ представляет собой N или T;

(e) CDR2 варибельной области легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность X₁ASX₄X₅X₆X₇ (SEQ ID NO: 138), где

X₁ представляет собой D или G;
 X₄ представляет собой N, S или T;
 X₅ представляет собой L или R;
 X₆ представляет собой A, E или K; и
 X₇ представляет собой S или T; и/или

(f) CDR3 варибельной области легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность QQX₃X₄X₅X₆PX₈T (SEQ ID NO: 139), где

X₃ представляет собой S или Y;
 X₄ представляет собой D, G или Y;
 X₅ представляет собой N, S или T;
 X₆ представляет собой L, T или Y; и
 X₈ представляет собой F или I.

Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающим молекулам против CLL-1, содержащим по меньшей мере одну последовательность CDR3 варибельной области тяжелой цепи или CDR3 варибельной области легкой цепи, представленную в настоящем описании. Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающим молекулам против CLL-1, содержащим по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 варибельной области тяжелой цепи согласно настоящему описанию. Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающим молекулам против CLL-1, содержащим по меньшей мере последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 варибельной области легкой цепи согласно настоящему описанию. Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающим молекулам против CLL-1, содержащим как последовательности CDR1, CDR2, CDR3 варибельной области тяжелой цепи, так и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 варибельной области легкой цепи со-

гласно настоящему описанию.

Настоящее изобретение также относится к способам лечения заболевания или расстройства у нуждающегося в этом субъекта, включающим введение указанному субъекту антигенсвязывающих молекул, CAR, TCR, полинуклеотидов, векторов, клеток или композиций в соответствии с настоящим изобретением. Подходящие заболевания включают, но не ограничиваются перечисленными, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММЛ), ювенильный миеломоноцитарный лейкоз, атипичный хронический миелоидный лейкоз, острый промиелоцитарный лейкоз (ОПЛ), острый монобластный лейкоз, острый эритроидный лейкоз, острый мегакариобластный лейкоз, миелодиспластический синдром (МДС), миелопролиферативное заболевание, миелоидное новообразование, миелоидную саркому, бластическое плазмцитомное дендритное клеточное новообразование (BPDCN) или их комбинации. Дополнительные заболевания включают воспалительные и/или аутоиммунные заболевания, такие как ревматоидный артрит, псориаз, аллергия, астма, болезнь Крона, ВЗК, СПК, фибромиалгия, мастоцитоз и целиакия.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показана экспрессия CLL-1 в различных линиях раковых клеток.

На фиг. 2 показана экспрессия CAR против CLL-1, определяемая по белку L, через 6 ч после электропорации мРНК.

На фиг. 3 показаны результаты анализа высвобождения цитокинов из различных сконструированных Т-клеток, экспрессирующих CAR против CLL-1, через 24 ч после электропорации мРНК.

На фиг. 4 показана цитолитическая активность различных сконструированных Т-клеток, экспрессирующих CAR против CLL-1, через 24 ч после электропорации мРНК.

На фиг. 5 показана цитолитическая активность различных сконструированных Т-клеток, экспрессирующих CAR против CLL-1, через 24 ч после электропорации мРНК.

На фиг. 6 показана экспрессия CAR против CLL-1, определяемая по белку L, на 12 день после трансдукции.

На фиг. 7 показаны результаты анализа высвобождения цитокинов из Т-клеток, экспрессирующих CAR против CLL-1, после совместного культивирования в течение 16 ч с различными линиями клеток-мишеней.

На фиг. 8 показана цитолитическая активность Т-клеток, экспрессирующих CAR против CLL-1, после совместного культивирования в течение 16 и 40 ч с различными линиями клеток-мишеней.

На фиг. 9А-9D представлены выравнивания последовательностей антигенсвязывающих молекул против CLL-1 согласно настоящему изобретению. CDR обозначены с помощью рамок.

На фиг. 10 представлены результаты измерений методом биолюминесцентной визуализации на мышцах NSG, подвергнутых действию CAR в соответствии с настоящим изобретением.

Карта вектора rGAR представлена на фиг. 11.

Подробное описание изобретения

Следует понимать, что химерные антигенные рецепторы (CAR или CAR-T) и Т-клеточные рецепторы (TCR) представляют собой рецепторы, созданные методами генетической инженерии. Эти сконструированные рецепторы могут легко быть введены в иммунные клетки и экспрессироваться иммунными клетками, включая Т-клетки, с применением способов, известных в данной области техники. С помощью CAR один и тот же рецептор может быть запрограммирован как на распознавание конкретного антигена, так и, при связывании с этим антигеном, на активацию иммунной клетки для атаки и разрушения несущей этот антиген клетки. В случае когда эти антигены присутствуют на опухолевых клетках, иммунная клетка, экспрессирующая CAR, может нацеливаться на опухолевую клетку и уничтожать ее.

CAR могут быть сконструированы для связывания с антигеном (таким как антиген клеточной поверхности) путем включения в них антигенсвязывающей молекулы, которая взаимодействует с этим антигеном-мишенью. Предпочтительно антигенсвязывающая молекула представляет собой фрагмент специфичного к этому антигену антитела и более предпочтительно один или более одноцепочечных фрагментов антитела ("scFv"). ScFv представляет собой одноцепочечный фрагмент антитела, содержащий соединенные друг с другом переменные области тяжелой и легкой цепей антитела. См. патенты США № 7741465 и 6319494; а также Eshhar et al., *Cancer Immunol. Immunotherapy* (1997), 45:131-136. ScFv сохраняет способность исходного антитела к специфичному взаимодействию с антигеном-мишенью. scFv предпочтительны для применения в химерных антигенных рецепторах, поскольку они могут быть сконструированы для экспрессии в виде части единственной цепи вместе с другими компонентами CAR [там же]. См. также Krause et al., *J. Exp. Med.*, vol. 188, № 4, 1998 (619-626); Finney et al., *Journal of Immunology*, 1998, 161:2791-2797. Следует понимать, что антигенсвязывающая молекула обычно содержится внутри внеклеточного участка CAR, так что она способна распознавать и связывать целевой антиген. Биспецифичные и мультиспецифичные CAR, имеющие специфичность более чем к одной целевой мишени, находятся в рамках настоящего изобретения.

Костимулирующие домены.

Химерные антигенные рецепторы могут содержать костимулирующие (сигнальные) домены для увеличения их активности. См. патенты США № 7741465 и 6319494; а также Krause et al. и Finney et al.

(см. выше); Song et al., Blood, 119:696-706 (2012); Kalos et al., Sci. Transl. Med., 3:95 (2011); Porter et al., N. Engl. J. Med., 365:725-33 (2011); и Gross et al., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 56:59-83 (2016). Например, CD28 представляет собой природный костимулирующий белок, обнаруженный на Т-клетках. В настоящем описании представлены различные костимулирующие молекулы, но следует понимать, что дополнительные костимулирующие молекулы также включены в объем настоящего изобретения.

Полная природная аминокислотная последовательность CD28 описана как эталонная последовательность NP_006130.1 в базе данных NCBI. Полная природная нуклеотидная последовательность CD28 описана как эталонная последовательность NM_006139.1 в базе данных NCBI.

Некоторые домены CD28 были использованы для химерных антигенных рецепторов. В соответствии с настоящим изобретением было обнаружено, что новый сконструированный внеклеточный (шарнирный) домен CD28, называемый "CD28T", неожиданно обеспечивает некоторые преимущества при применении в конструкции CAR. Эта конструкция демонстрирует способность сохранять (и в некоторых случаях превосходить) свойства CAR, содержащих CD28, несмотря на усечение (удаление) нескольких аминокислот из последовательности внеклеточного участка CD28. Эти преимущества включают эквивалентную или лучшую выработку цитокинов, эквивалентную или лучшую цитолитическую активность и/или эквивалентные или лучшие уровни экспрессии CAR.

Нуклеотидная последовательность молекулы CD28T, содержащей внеклеточный домен и трансмембранный и внутриклеточный домены CD28, представляет собой SEQ ID NO: 1:

CTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAAACAATCATTCACGTGAAGGGCAAGC
 ACCTCTGTCCGTCACCCTTGTTCCCTGGTCCATCCAAGCCATTCTGGGTGT
 TGGTCGTAGTGGGTGGAGTCCCTCGCTTGTTACTCTCTGCTCGTCACCGTG
 GCTTTTATAATCTTCTGGGTAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAG
 CGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACAC
 TACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTGCTGCCTATCGGAGC

Соответствующая аминокислотная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 2:

LDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWLVVVGGVLACYSLLVTVAF
 IIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAAYRS

Нуклеотидная последовательность внеклеточного участка CD28T представляет собой SEQ ID NO: 3:

CTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAAACAATCATTCACGTGAAGGGCAAGC
 ACCTCTGTCCGTCACCCTTGTTCCCTGGTCCATCCAAGCCA

Соответствующая аминокислотная последовательность внеклеточного домена CD28T представляет собой SEQ ID NO: 4:

LDNEKSNGTIHVKGKHLCPSPFPGPSKPF

Нуклеотидная последовательность трансмембранного домена CD28 представляет собой SEQ ID NO: 5:

TTCTGGGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGAGTCCCTCGCTTGTTACTCTCTGCTC
 GTCACCGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTT

Аминокислотная последовательность трансмембранного домена CD28 представляет собой SEQ ID NO: 6:

FWVLVVVGGV LACYSLLVTVAFIIFWV

Нуклеотидная последовательность внутриклеточного сигнального домена CD28 представляет собой SEQ ID NO: 7:

AGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTC
 CACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACC
 TAGAGATTTGCTGCCTATCGGAGC

Аминокислотная последовательность внутриклеточного сигнального домена CD28 представляет собой SEQ ID NO: 8:

RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAAYRS

Дополнительные последовательности CD28, подходящие для применения в соответствии с настоящим изобретением, включают нуклеотидную последовательность CD28, представляющую собой SEQ ID NO: 11:

ATTGAGGTGATGTATCCACCGCCTTACCTGGATAACGAAAAGAGTAACG
 GTACCATCATTCACGTGAAAGGTAACACCTGTGTCCTTCTCCCCTCTTC
 CCCGGGCCATCAAAGCCC

Соответствующая аминокислотная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 12:

IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPF

Следует понимать, что настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам, CAR, TCR и им подобным, содержащим по меньшей мере одну выделенную нуклеотидную последователь-

ность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3. Также следует понимать, что настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам, CAR, TCR и им подобным, где внеклеточный участок состоит из по меньшей мере одной выделенной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3. Кроме того, следует понимать, что настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам, CAR, TCR и им подобным, где внеклеточный участок состоит по существу из по меньшей мере одной выделенной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

Следует понимать, что настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам, CAR, TCR и им подобным, содержащим по меньшей мере одну аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4. Также следует понимать, что настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам, CAR, TCR и им подобным, где внеклеточный участок состоит из по меньшей мере одной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4. Также следует понимать, что настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам, CAR, TCR и им подобным, где внеклеточный участок состоит по существу из по меньшей мере одной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4.

Другой подходящий источник внеклеточных и/или трансмембранных доменов может быть получен из (или соответствовать) некоторым участкам или всей молекулы CD8. Нуклеотидная последовательность подходящего внеклеточного и трансмембранного домена CD8 представляет собой SEQ ID NO: 13:

```
GCTGCAGCATTGAGCAACTCAATAATGTATTTTAGTCACTTTGTACCAGT
GTTCTTGCCGGCTAAGCCTACTACCACACCCGCTCCACGGCCACCTACCC
CAGCTCCTACCATCGCTTCACAGCCTCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCTTGC
CGACCGGCCGCAGGGGGCGCTGTTTCATACCAGAGGACTGGATTTCCGCT
GCGATATCTATATCTGGGCACCCCTGGCCGGAACCTGCGGCGTACTCCTG
CTGTCCCTGGTCATCACGCTCTATTGTAATCACAGGAAC
```

Соответствующая аминокислотная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 14:

```
AAALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA
GGAVHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN
```

Следует понимать, что подходящие костимулирующие домены в рамках настоящего изобретения могут быть получены из (или соответствовать), например, CD28, CD28T, OX40, 4-1BB/CD137, CD2, CD3 (альфа, бета, дельта, эпсилон, гамма, дзета), CD4, CD5, CD7, CD9, CD16, CD22, CD27, CD30, CD33, CD37, CD40, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, PD-1, ICOS, ассоциированного с функцией лимфоцитов антигена-1 (LFA-1 (CD1 la/CD18), CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT (члена 14 суперсемейства фактора некроза опухолей; TNFSF14), NKG2C, Ig альфа (CD79a), DAP-10, Fc-рецептора гамма, молекулы MHC класса I, ФНО, TNF α , интегрин, сигнальной молекулы активации лимфоцитов, BTLA, рецептора Toll лиганда, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8 альфа, CD8 бета, IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDI-Id, ITGAE, CD103, ITGAL, CDI-la, LFA-1, ITGAM, CDI-lb, ITGAX, CDI-lc, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, лиганда CD83 или их фрагментов или комбинаций. Следует понимать, что дополнительные костимулирующие молекулы или их фрагменты, не перечисленные выше, включены в объем настоящего изобретения.

Домены активации.

CD3 представляет собой элемент Т-клеточного рецептора на природных Т-клетках, и было показано, что он является важным внутриклеточным активирующим элементом в CAR. В предпочтительном варианте реализации CD3 представляет собой CD3 дзета, нуклеотидная последовательность которого представляет собой SEQ ID NO: 9:

```
AGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCC
AGAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATG
ACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACC
AAGACGAAAAAACCCCAAGGAGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGA
TAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAG
AAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACG
AAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGG
```

Соответствующая аминокислотная последовательность внутриклеточного CD3 дзета представляет собой SEQ ID NO: 10:

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPR
RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT
YDALHMQALPPR

Ориентация домена относительно клетки.

Следует понимать, что домены согласно настоящему описанию с точки зрения структуры соответствуют положению относительно иммунной или другой клетки. Таким образом, эти домены могут быть частью

- (i) "шарнирного" или внеклеточного (EC) домена;
- (ii) трансмембранного (TM) домена; и/или
- (iii) внутриклеточного/цитоплазматического домена (IC).

Внутриклеточный компонент часто содержит в том числе домен активации, такой как участок члена семейства CD3, предпочтительно CD3 дзета. Этот домен способен активировать Т-клетку при связывании антигенсвязывающей молекулы с ее мишенью. Следует понимать, что внутриклеточный домен обычно дополнительно содержит одну или более костимулирующих молекул согласно настоящему описанию.

"Активация" или "стимуляция" в настоящем описании относится к первичному ответу, индуцируемому путем связывания активирующей молекулы с ее когнатным лигандом, при этом указанное связывание опосредует событие передачи сигнала.

"Активирующая молекула" или "стимулирующая молекула" относится к молекуле на Т-клетке, например комплексу TCR/CD3, который специфично связывается с когнатным стимулирующим лигандом, присутствующим на антигенпрезентирующей клетке. Подходящие активирующие молекулы описаны в настоящем описании.

"Костимулирующая молекула" в настоящем описании относится к молекуле, обеспечивающей сигнал, который опосредует Т-клеточный ответ, включающий, но не ограничивающийся перечисленными, пролиферацию, активацию, дифференцировку и т.п. Костимулирующие молекулы могут обеспечивать сигнал, который является дополнением к первичному сигналу, обеспечиваемому активирующей молекулой согласно настоящему описанию.

Подходящие костимулирующие молекулы включают, но не ограничиваются перечисленными, целые молекулы или участки CD28, CD28T, OX40, 4-1BB/CD137, CD2, CD3 (альфа, бета, дельта, эпсилон, гамма, дзета), CD4, CD5, CD7, CD9, CD16, CD22, CD27, CD30, CD33, CD37, CD40, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, PD-1, ICOS, ассоциированного с функцией лимфоцитов антигена-1 (LFA-1 (CD11a/CD18), CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT (члена 14 суперсемейства фактора некроза опухолей; TNFSF14), NKG2C, Ig альфа (CD79a), DAP-10, Fc-рецептора гамма, молекулы MHC класса I, ФНО, TNF α , интегрин, сигнальной молекулы активации лимфоцитов, BTLA, рецептора Toll лиганда, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8 альфа, CD8 бета, IL2R бета, IL2R гамма, IL7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, лиганда CD83 или их фрагменты или комбинации. Следует понимать, что шарнирный участок может содержать некоторые или все из членов семейства иммуноглобулинов, такие как IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE, IgM или их фрагмент.

В некоторых вариантах реализации внеклеточный домен расположен между антигенсвязывающей молекулой и трансмембранным доменом.

Примеры конструкций CAR в соответствии с настоящим изобретением представлены в табл. 1.

Таблица 1

Название конструкции	scFv	Шарнирный домен	Домен активации
24C1 CD28T	24C1	CD28T	CD3 дзета
24C1 CD28	24C1	CD28	CD3 дзета
24C1 CD8	24C1	CD8	CD3 дзета
24C8 CD28T	24C8	CD28T	CD3 дзета
24C8 CD28	24C8	CD28	CD3 дзета
24C8 CD8	24C8	CD8	CD3 дзета
20C5.1 CD28T	20C5.1	CD28T	CD3 дзета
20C5.1 CD28	20C5.1	CD28	CD3 дзета
20C5.1 CD8	20C5.1	CD8	CD3 дзета
20C5.2 CD28T	20C5.2	CD28T	CD3 дзета
20C5.2 CD28	20C5.2	CD28	CD3 дзета
20C5.2 CD8	20C5.2	CD8	CD3 дзета

Как было отмечено, конструированные Т-клетки согласно настоящему изобретению содержат антигенсвязывающую молекулу (такую как scFv), внеклеточный домен (который может содержать "шарнирный" домен), трансмембранный домен и внутриклеточный домен. Внутриклеточный домен может содержать по меньшей мере частично домен активации, предпочтительно состоящий из члена семейства CD3, такого как CD3 дзета, CD3 эпсилон, CD3 гамма или их участки.

Также следует понимать, что антигенсвязывающая молекула (например, один или более scFv) сконструирована таким образом, что она расположена во внеклеточном участке молекулы/конструкции, так что она способна распознавать и связывать ее мишень или мишени.

Внеклеточный домен. Внеклеточные домены, применяемые, в частности, в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены из (т.е. содержать) всех или некоторых из CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, белка 1 программируемой смерти (PD-1), индуцибельного костимулятора Т-клеток (ICOS), ассоциированного с функцией лимфоцитов антигена-1 (LFA-1, CD1-1a/CD18), CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig альфа (CD79a), DAP-10, Fc-рецептора гамма, молекулы МНС класса I, белков-рецепторов ФНО, белка иммуноглобулина, рецептора цитокина, интегринов, сигнальных молекул активации лимфоцитов (белков SLAM), активирующих рецепторов NK-клеток, BTLA, рецептора Toll лиганда, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8 альфа, CD8 бета, IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R 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, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, лиганда, специфично связывающегося с CD83, или любой их комбинации. Внеклеточный домен может быть получен либо из природного, либо из синтетического источника.

Внеклеточные домены часто содержат шарнирный участок, иногда называемый "спейсерным" участком. В соответствии с настоящим изобретением могут применяться различные шарнирные участки, включая участки или производные молекул согласно настоящему описанию.

В некоторых вариантах реализации шарнирный участок содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или 100% идентична аминокислотным последовательностям внеклеточного домена, представленным в настоящем описании.

В некоторых вариантах реализации шарнирный участок содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере

мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или 100% идентична аминокислотным последовательностям внеклеточного участка, представленным в настоящем описании.

Трансмембранный домен.

CAR может быть сконструирован таким образом, что его трансмембранный домен является слитым с внеклеточным доменом CAR. Аналогично он может быть слитым с внутриклеточным доменом CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен может быть выбран или модифицирован путем замены аминокислоты во избежание связывания таких доменов с трансмембранными доменами тех же самых или других поверхностных мембранных белков для минимизации взаимодействий с другими членами рецепторного комплекса. Трансмембранный домен может быть получен либо из природного, либо из синтетического источника. В случае природного источника этот домен может быть получен из любого связанного с мембраной или трансмембранного белка. Трансмембранные участки, применяемые, в частности, в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены из (содержать или соответствовать) CD28, CD28T, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, белка 1 программируемой смерти (PD-1), индуцибельного костимулятора Т-клеток (ICOS), ассоциированного с функцией лимфоцитов антигена-1 (LFA-1, CD1-1a/CD18), CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig альфа (CD79a), DAP-10, Fc-рецептора гамма, молекулы МНС класса I, белков-рецепторов ФНО, белка иммуноглобулина, рецептора цитокина, интегринов, сигнальных молекул активации лимфоцитов (белков SLAM), активирующих рецепторов NK-клеток, BTLA, рецептора Toll лиганда, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8 альфа, CD8 бета, IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R 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, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, лиганда, специфично связывающегося с CD83, или любой их комбинации.

Необязательно короткие линкеры могут образовывать связи между любыми или некоторыми из внеклеточных, трансмембранных и внутриклеточных доменов CAR.

В других вариантах реализации трансмембранный домен в CAR согласно настоящему изобретению представляет собой трансмембранный домен CD8. В одном варианте реализации трансмембранный домен CD8 содержит трансмембранный участок, которому соответствует нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 13. В другом варианте реализации трансмембранный домен CD8 содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность трансмембранного участка, содержащуюся внутри SEQ ID NO: 14.

В некоторых вариантах реализации трансмембранный домен в CAR согласно настоящему изобретению представляет собой трансмембранный домен CD28. В одном варианте реализации трансмембранный домен CD28 содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5. В одном варианте реализации трансмембранный домен CD28 содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В другом варианте реализации трансмембранный домен CD28 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

Внутриклеточный (цитоплазматический) домен. Внутриклеточный (цитоплазматический) домен сконструированных Т-клеток согласно настоящему изобретению может обеспечивать активацию по меньшей мере одной из нормальных эффекторных функций иммунной клетки. Эффекторная функция Т-клетки, например, может относиться к цитолитической активности или хелперной активности, включая секрецию цитокинов.

Следует понимать, что подходящие внутриклеточные молекулы включают (т.е. содержат), но не ограничиваются перечисленными, сигнальные домены, полученные из (или соответствующие) CD28, CD28T, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, белка 1 программируемой смерти (PD-1), индуцибельного костимулятора Т-клеток (ICOS), ассоциированного с функцией лимфоцитов антигена-1 (LFA-1, CD1-1a/CD18), CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig альфа (CD79a), DAP-10, Fc-рецептора гамма, молекулы МНС класса I, белков-рецепторов ФНО, белка иммуноглобулина, рецептора цитокина, интегринов, сигнальных молекул активации лимфоцитов (белков SLAM), активирующих рецепторов NK-клеток, BTLA, рецептора Toll лиганда, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8 альфа, CD8 бета, IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R 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, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, лиганда, специфично связывающегося с CD83, или любую их комбинацию.

В предпочтительном варианте реализации внутриклеточный/цитоплазматический домен CAR мо-

жет быть сконструирован таким образом, что он содержит домен CD3 дзета как таковой или в комбинации с одним или более любыми другими желаемыми внутриклеточными доменами, подходящими в контексте применения в CAR согласно настоящему изобретению. Например, внутриклеточный домен CAR может содержать участок цепи CD3 дзета и участок костимулирующей сигнальной молекулы. Внутриклеточные сигнальные последовательности внутри внутриклеточного сигнального участка CAR согласно настоящему изобретению могут быть связаны друг с другом в произвольном или заданном порядке.

В другом предпочтительном варианте реализации внутриклеточный домен сконструирован таким образом, что он содержит домен активации CD3 дзета и сигнальный домен CD28. В другом варианте реализации внутриклеточный домен сконструирован таким образом, что он содержит домен активации CD3 дзета и сигнальный домен 4-1BB. В другом варианте реализации внутриклеточный домен в CAR сконструирован таким образом, что он содержит участок CD28 и CD3 дзета, при этом внутриклеточный участок CD28 содержит нуклеотидную последовательность, представляющую собой SEQ ID NO: 7, и аминокислотную последовательность, представляющую собой SEQ ID NO: 8. Нуклеотидная последовательность CD3 дзета представляет собой SEQ ID NO: 9, а его аминокислотная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 8.

Следует понимать, что одна предпочтительная ориентация CAR согласно настоящему изобретению содержит антигенсвязывающую молекулу (такую как scFv) в тандеме с внеклеточным и/или шарнирным доменом, костимулирующим доменом и доменом активации. Также следует понимать, что в тандеме могут применяться несколько доменов.

В некоторых вариантах реализации предложены выделенные нуклеиновые кислоты, содержащие промотор, который функционально связан с первым полинуклеотидом, кодирующим антигенсвязывающую молекулу, по меньшей мере одну костимулирующую молекулу и домен активации. В некоторых вариантах реализации конструкция нуклеиновой кислоты содержится внутри вирусного вектора. В некоторых вариантах реализации вирусный вектор выбран из группы, состоящей из ретровирусных векторов, векторов на основе вируса лейкоза мышей, SFG-векторов, аденовирусных векторов, лентивирусных векторов, аденоассоциированных вирусных векторов (AAV), векторов на основе вируса простого герпеса и векторов на основе вируса осповакцины. В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота содержится внутри плазмиды.

В некоторых вариантах реализации сконструированная иммунная клетка представляет собой Т-клетку, инфильтрующий опухоль лимфоцит (TIL), NK-клетку, экспрессирующую TCR клетку, дендритную клетку или NK-Т-клетку. В некоторых вариантах реализации клетку получают или выделяют из периферической крови. В некоторых вариантах реализации клетку получают или выделяют из мононуклеарных клеток периферической крови (МПКК). В некоторых вариантах реализации клетку получают или выделяют из костного мозга. В некоторых вариантах реализации клетку получают или выделяют из пуповинной крови. В некоторых вариантах реализации клетка представляет собой клетку человека. В некоторых вариантах реализации клетку трансфицируют или трансдуцируют с помощью вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, с применением способа, выбранного из группы, состоящей из электропорации, сонопорации, баллистической трансфекции (например, технологии Gene Gun), трансфекции с использованием липидов, трансфекции с использованием полимеров, наночастиц или полиплексов.

В некоторых вариантах реализации химерные антигенные рецепторы экспрессируются в сконструированных иммунных клетках, которые содержат нуклеиновые кислоты согласно настоящей заявке. В некоторых вариантах реализации эти химерные антигенные рецепторы согласно настоящей заявке могут содержать

- (i) антигенсвязывающую молекулу (такую как scFv);
- (ii) трансмембранный участок; и
- (iii) молекулу или участок активации Т-клеток.

Также следует понимать, что в настоящем описании во всех случаях описания аспектов с использованием термина "содержащий" также предложены аналогичные аспекты, описанные иначе в терминах "состоящий из" и/или "состоящий по существу из".

Кроме того, термины "примерно" или "состоящий по существу из" относятся к значению или составу, которые находятся в пределах допустимого диапазона погрешностей для конкретного значения или состава, определяемого специалистом в данной области техники, и данный диапазон отчасти будет зависеть от способа измерения или определения значения или состава, т.е. от ограничений измерительной системы. Например, "примерно" или "состоящий по существу из" на практике в данной области техники может означать в пределах 1 или более чем 1 стандартных отклонений. Альтернативно "примерно" или "состоящий по существу из" может означать диапазон до 10% (т.е. $\pm 10\%$). Например, приблизительно 3 мг может включать любое количество от 2,7 до 3,3 мг (для 10%). Кроме того, в частности, в отношении биологических систем или процессов, указанные термины могут иметь значение до порядка величины или до 5-кратного значения величины. В случаях когда в настоящей заявке и прилагаемой формуле изобретения предложены конкретные значения или составы, если не указано иное, следует считать, что "примерно" или "состоящий по существу из" означают нахождение в пределах допустимого диапазона погрешностей для этого конкретного значения или состава.

Антигенсвязывающие молекулы.

Антигенсвязывающие молекулы включены в объем настоящего изобретения. "Антигенсвязывающая молекула" в настоящем описании означает любой белок, который связывает специфичный антиген-мишень. В настоящей заявке специфичный антиген-мишень представляет собой белок CLL-1 или его фрагмент. Антигенсвязывающие молекулы включают, но не ограничиваются перечисленными, антитела и их связывающие участки, такие как иммунологически функциональные фрагменты. Пептитела (т.е. слитые с Fc молекулы, содержащие пептидсвязывающие домены) представляют собой другой пример подходящих антигенсвязывающих молекул.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к антигенсвязывающей молекуле, содержащей

(a) участок, определяющий комплементарность (CDR), 1 варибельной области тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность $GX_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ (SEQ ID NO: 134), где

X_2 представляет собой G, F или Y;

X_3 представляет собой S или T;

X_4 представляет собой I, F или L;

X_5 представляет собой S или T;

X_6 отсутствует или представляет собой S;

X_7 отсутствует или представляет собой G;

X_8 отсутствует или представляет собой E или G; и

X_9 представляет собой F, L или Y;

(b) участок, определяющий комплементарность (CDR), 2 варибельной области тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ (SEQ ID NO: 135), где

X_1 представляет собой D, H, S или Y;

X_2 представляет собой H, P или Y;

X_3 представляет собой D, E или S;

X_4 представляет собой D или G;

X_5 представляет собой G или S; и

X_6 отсутствует или представляет собой D или E;

(c) участок, определяющий комплементарность (CDR), 3 варибельной области тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}DY$ (SEQ ID NO: 136), где

X_1 представляет собой E или L;

X_2 представляет собой R, S или V;

X_3 представляет собой R или Y;

X_4 представляет собой C, G или S;

X_5 отсутствует или представляет собой G или I;

X_6 отсутствует или представляет собой G;

X_7 отсутствует или представляет собой D;

X_8 отсутствует или представляет собой C;

X_9 отсутствует или представляет собой W или Y;

X_{10} отсутствует или представляет собой P или S;

X_{11} отсутствует или представляет собой G или Y; и

X_{12} представляет собой F или R;

(d) CDR1 варибельной области легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность $X_1ASQX_5X_6X_7X_8X_9LX_{11}$ (SEQ ID NO: 137), где

X_1 представляет собой Q или R;

X_5 представляет собой D или S;

X_6 представляет собой I или V;

X_7 представляет собой N или S;

X_8 представляет собой N или S;

X_9 представляет собой F, L или Y; и

X_{11} представляет собой N или T;

(e) CDR2 варибельной области легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность $X_1ASX_4X_5X_6X_7$ (SEQ ID NO: 138), где

X_1 представляет собой D или G;

X_4 представляет собой N, S или T;

X_5 представляет собой L или R;

X_6 представляет собой A, E или K; и

X_7 представляет собой S или T; и/или

(f) CDR3 варибельной области легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность $QQX_3X_4X_5X_6PX_8T$ (SEQ ID NO: 139), где

X_3 представляет собой S или Y;

X₄ представляет собой D, G или Y;

X₅ представляет собой N, S или T;

X₆ представляет собой L, T или Y; и

X₈ представляет собой F или I.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам, содержащим по меньшей мере один из

(a) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 51, 73, 95, 5 и 97;

(b) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 52, 74, 96;

(c) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, 53, 75 и 97;

(d) CDR1 варибельной области легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 56, 78 и 100;

(e) CDR2 варибельной области легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 57, 79 и 101;

(f) CDR3 варибельной области легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 58, 80 и 102.

В других вариантах реализации изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам (и химерным антигенным рецепторам, содержащим эти молекулы), содержащим по меньшей мере один из

(a) области VH, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и области VL, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21;

(b) области VH, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, и области VL, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55;

(c) области VH, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72, и области VL, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77;

(d) области VH, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94, и области VL, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99,

при этом область или области VH и VL соединены с помощью по меньшей мере одного линкера.

В других вариантах реализации настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам (и химерным антигенным рецепторам, содержащим эти молекулы), где линкер содержит по меньшей мере одну из последовательностей SEQ ID NO: 130 и SEQ ID NO: 132.

В других вариантах реализации настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам, содержащим CDR3 варибельной области легкой цепи (V_L), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 58, 80 и 102.

В других вариантах реализации настоящее изобретение относится к выделенным полинуклеотидам, кодирующим антигенсвязывающую молекулу, которая специфично связывается с CLL-1, при этом тяжелая цепь указанной антигенсвязывающей молекулы содержит CDR1 (SEQ ID NO: 17), CDR2 (SEQ ID NO: 18) и CDR3 (SEQ ID NO: 19), а легкая цепь указанной антигенсвязывающей молекулы содержит CDR1 (SEQ ID NO: 22), CDR2 (SEQ ID NO: 23) и CDR3 (SEQ ID NO: 24).

В других вариантах реализации настоящее изобретение относится к антигенсвязывающей молекуле, которая специфично связывается с CLL-1, при этом тяжелая цепь указанной антигенсвязывающей молекулы содержит CDR1 (SEQ ID NO: 51), CDR2 (SEQ ID NO: 52) и CDR3 (SEQ ID NO: 53), а легкая цепь указанной антигенсвязывающей молекулы содержит CDR1 (SEQ ID NO: 56), CDR2 (SEQ ID NO: 57) и CDR3 (SEQ ID NO: 58).

В других вариантах реализации настоящее изобретение относится к антигенсвязывающей молекуле, которая специфично связывается с CLL-1, при этом тяжелая цепь указанной антигенсвязывающей молекулы содержит CDR1 (SEQ ID NO: 73), CDR2 (SEQ ID NO: 74) и CDR3 (SEQ ID NO: 75), а легкая цепь указанной антигенсвязывающей молекулы содержит CDR1 (SEQ ID NO: 78), CDR2 (SEQ ID NO: 79) и CDR3 (SEQ ID NO: 80).

В других вариантах реализации настоящее изобретение относится к выделенным полинуклеотидам, кодирующим антигенсвязывающую молекулу, которая специфично связывается с CLL-1, при этом тяжелая цепь указанной антигенсвязывающей молекулы содержит CDR1 (SEQ ID NO: 95), CDR2 (SEQ ID NO: 96) и CDR3 (SEQ ID NO: 97), а легкая цепь указанной антигенсвязывающей молекулы содержит CDR1 (SEQ ID NO: 100), CDR2 (SEQ ID NO: 101) и CDR3 (SEQ ID NO: 102).

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему антигенсвязывающую молекулу против CLL-1, которая перекрестно конкурирует с одним или более антителами согласно настоящему описанию, или к антигенсвязывающей молекуле, кодируемой указанным полинуклеотидом. В одном варианте реализации настоящее изобретение относится к выделенным полинуклеотидам, кодирующим антигенсвязывающую молекулу против CLL-1, которая связывается с тем же самым эпитопом, что и одна или более антигенсвязывающих молекул согласно настоящему описанию.

В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающая молекула связывается с антигеном на опухолевой клетке. В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающая молекула связывается с антигеном на клетке, участвующей в гиперпролиферативном заболевании, или с вирусным или бактериальным антигеном. В других вариантах реализации антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело или его фрагмент, содержащий один или более участков, определяющих комплементарность (CDR), этого антитела. В других вариантах реализации антигенсвязывающая молекула представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv).

Термин "иммунологически функциональный фрагмент" (или "фрагмент") антигенсвязывающей молекулы относится к виду антигенсвязывающей молекулы, содержащей участок (независимо от способа получения или синтеза этого участка) антитела, который не содержит по меньшей мере некоторых аминокислот, присутствующих в полноразмерной цепи, но который все еще способен специфично связываться с антигеном. Такие фрагменты биологически активны за счет того, что они связываются с антигеном-мишенью и могут конкурировать с другими антигенсвязывающими молекулами, включая интактные антитела, за связывание с данным эпитопом. В некоторых вариантах реализации фрагменты представляют собой нейтрализующие фрагменты. В некоторых вариантах реализации фрагменты могут блокировать или уменьшать активность CLL-1. В одном аспекте такой фрагмент сохранит по меньшей мере один CDR, присутствующий в полноразмерной легкой или тяжелой цепи, и в некоторых вариантах реализации фрагмент будет содержать единственную тяжелую цепь и/или легкую цепь или ее участок. Эти фрагменты могут быть получены с помощью технологии рекомбинантных ДНК или могут быть получены путем ферментативного или химического расщепления антигенсвязывающих молекул, включая интактные антитела.

Имунологически функциональные фрагменты иммуноглобулина включают, но не ограничиваются перечисленными, фрагменты scFv, фрагменты Fab (Fab¹, F(ab')₂ и т.п.), один или более CDR, домен (вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи в составе одного и того же полипептида, соединенные с помощью короткого пептидного линкера, который является слишком коротким для того, чтобы спаривание между двумя указанными доменами в одной и той же цепи было возможным), доменные антитела и одноцепочечные антитела. Эти фрагменты могут быть получены из любого источника, относящегося к млекопитающему, включающему, но не ограничивающемуся перечисленными, человека, мышь, крысу, животное семейства верблюдовых или кролика. Специалисту в данной области техники будет понятно, что антигенсвязывающая молекула может содержать небелковые компоненты.

Варианты антигенсвязывающих молекул также включены в объем настоящего изобретения, например вариабельные области легкой и/или тяжелой цепей, каждая из которых на по меньшей мере 70-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-97%, 97-99% или более 99% идентична аминокислотным последовательностям, представляющим собой последовательности согласно настоящему описанию. В некоторых случаях такие молекулы содержат по меньшей мере одну тяжелую цепь и одну легкую цепь, тогда как в других случаях варианты формы содержат две идентичные легкие цепи и две идентичные тяжелые цепи (или их субчасти). Специалист в данной области техники сможет определить подходящие варианты антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем описании, с применением хорошо известных методов. В некоторых вариантах реализации специалист в данной области техники может идентифицировать подходящие участки молекулы, которые могут быть изменены без нарушения активности, путем нацеливания на участки, которые не считаются важными для обеспечения активности.

В некоторых вариантах реализации основу полипептидной структуры антигенсвязывающих молекул составляют антитела, включающие, но не ограничивающиеся перечисленными, моноклональные антитела, биспецифичные антитела, миниантитела, доменные антитела, синтетические антитела (иногда упоминаемые в настоящем описании как "миметики антител"), химерные антитела, гуманизированные антитела, антитела человека, слитые антитела (иногда упоминаемые в настоящем описании как "конъюгаты антител") и их фрагменты соответственно. В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающая молекула содержит или состоит из авимеров.

В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающую молекулу против CLL-1 вводят в виде части CAR, TCR или другой иммунной клетки. В таких иммунных клетках антигенсвязывающая молекула против CLL-1 может находиться под контролем той же самой промоторной области или отдельного промотора. В некоторых вариантах реализации гены, кодирующие белковые агенты и/или антигенсвязывающую молекулу против CLL-1, могут находиться в отдельных векторах.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим антигенсвязывающую молекулу против CLL-1, вместе с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем, солибилизатором, эмульгатором, консервантом и/или адьювантом. В некоторых вариантах реализации фармацевтические композиции будут содержать более одной различных антигенсвязывающих молекул против CLL-1. В некоторых вариантах реализации фармацевтические композиции будут содержать более одной антигенсвязывающих молекул против CLL-1, которые связывают более одного эпитопа. В некоторых вариантах реализации различные антигенсвязывающие молекулы не будут конкурировать друг с другом за связывание с CLL-1.

В других вариантах реализации фармацевтическая композиция может быть выбрана для парентеральной доставки, для ингаляции или для доставки через пищеварительный тракт, как то перорально. Получение таких фармацевтически приемлемых композиций находится в пределах возможностей специалиста в данной области техники. В некоторых вариантах реализации используют буферы для поддержания композиции при физиологическом рН или при несколько более низком рН, как правило, в диапазоне рН от приблизительно 5 до приблизительно 8. В некоторых вариантах реализации, в случае если предусмотрено парентеральное введение, терапевтическая композиция может находиться в форме апиrogenного, приемлемого для парентерального введения водного раствора, содержащего желаемую антигенсвязывающую молекулу против CLL-1, совместно с дополнительными терапевтическими агентами или без них, в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых вариантах реализации носитель для парентеральной инъекции представляет собой стерильную дистиллированную воду, в которой антигенсвязывающую молекулу против CLL-1, совместно с по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим агентом или без него, готовят в виде стерильного изотонического раствора, содержащего подходящие консерванты. В некоторых вариантах реализации препарат может содержать состав желаемой молекулы с полимерными соединениями (такими как полимолочная кислота или полигликолевая кислота), частицами или липосомами, которые могут обеспечивать контролируемое или замедленное высвобождение продукта, который затем может быть доставлен посредством инъекции веществ замедленного всасывания. В некоторых вариантах реализации для введения желаемой молекулы могут быть использованы имплантируемые устройства для доставки лекарственных средств.

В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающую молекулу применяют в качестве средства для диагностики или подтверждения. Антигенсвязывающая молекула может применяться для анализа количества CLL-1, присутствующего в образце и/или организме субъекта. В некоторых вариантах реализации диагностическая антигенсвязывающая молекула не является нейтрализующей. В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающие молекулы, раскрытые в настоящем описании, применяются или обеспечиваются в наборе для анализа и/или способе детектирования CLL-1 в тканях или клетках млекопитающих для скрининга/диагностики заболевания или расстройства, связанного с изменениями уровней CLL-1. Указанный набор может содержать антигенсвязывающую молекулу, которая связывает CLL-1, вместе со средствами для оценки связывания антигенсвязывающей молекулы с CLL-1, если она присутствует, и необязательно уровнем белка CLL-1.

Антигенсвязывающие молекулы будут более понятными с учетом приведенных ниже определений и описаний.

Участок "Fc" содержит два фрагмента тяжелой цепи, содержащие домены CH1 и CH2 антитела. Два фрагмента тяжелой цепи удерживаются вместе за счет двух или более дисульфидных связей и гидрофобных взаимодействий доменов CH3.

"Фрагмент Fab" содержит одну легкую цепь и CH1 и переменные области одной тяжелой цепи. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать дисульфидную связь с другой молекулой тяжелой цепи. "Фрагмент Fab'" содержит одну легкую цепь и участок одной тяжелой цепи, который содержит домен VH и домен CH1, а также участок между доменами CH1 и CH2, так что между двумя тяжелыми цепями двух фрагментов Fab' может образовываться межцепочечная дисульфидная связь с образованием молекулы F(ab')₂. "Фрагмент F(ab')₂" содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, содержащие участок константного участка между доменами CH1 и CH2, так что между двумя тяжелыми цепями образуется межцепочечная дисульфидная связь. Таким образом, фрагмент F(ab')₂ состоит из двух фрагментов Fab', которые удерживаются вместе за счет дисульфидной связи между двумя тяжелыми цепями.

"Участок Fv" содержит переменные области как тяжелой, так и легкой цепей, но не содержит константных участков.

"Одноцепочечный переменный фрагмент" ("scFv", также называемый "одноцепочечным антителом") относится к молекулам Fv, в которых переменные области тяжелой и легкой цепей соединены с помощью гибкого линкера с образованием одной полипептидной цепи, которая образует антигенсвязывающий участок. См. заявку PCT WO 88/01649 и патенты США № 4946778 и 5260203, полное раскрытие которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

"Бивалентная антигенсвязывающая молекула" содержит два антигенсвязывающих сайта. В некоторых случаях два связывающих сайта имеют одинаковые антигенные специфичности. Бивалентные антигенсвязывающие молекулы могут быть биспецифичными. "Мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула" представляет собой молекулу, которая нацелена на более чем один антиген или эпитоп. "Биспецифичная", "двойственно-специфичная" или "бифункциональная" антигенсвязывающая молекула представляет собой гибридную антигенсвязывающую молекулу или антитело, соответственно содержащие два различных антигенсвязывающих сайта. Два связывающих сайта биспецифичной антигенсвязывающей молекулы будут связываться с двумя различными эпитопами, которые могут находиться на одних и тех же или различных белковых мишенях.

Считается, что антигенсвязывающая молекула "специфично связывает" ее антиген-мишень, когда константа диссоциации (K_d) составляет ~1×10⁻⁷ М. Антигенсвязывающая молекула специфично связыва-

ет антиген с "высокой аффинностью", когда K_d составляет $1-5 \times 10^{-9}$ М и с "очень высокой аффинностью", когда K_d составляет $1-5 \times 10^{-10}$ М. В одном варианте реализации антигенсвязывающая молекула характеризуется K_d 10^{-9} М. В одном варианте реализации скорость диссоциации составляет $<1 \times 10^{-5}$. В других вариантах реализации антигенсвязывающие молекулы будут связываться с CLL-1 человека с K_d , составляющей от приблизительно 10^{-7} до 10^{-13} М, и в еще одном варианте реализации антигенсвязывающие молекулы будут связываться с K_d , составляющей $1,0-5 \times 10^{-10}$.

В некоторых вариантах реализации антитело или антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению специфично связывают CLL-1 (например, hCLL-1). В некоторых вариантах реализации антитело против CLL-1 или антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению связывает CLL-1 человека с K_D , составляющей менее чем 1×10^{-6} М, менее чем 1×10^{-7} М, менее чем 1×10^{-8} М или менее чем 1×10^{-9} М. В одном конкретном варианте реализации антитело против CLL-1 или антигенсвязывающие молекулы связывают CLL-1 человека с K_D , составляющей менее чем 1×10^{-7} М. В другом варианте реализации антитело против CLL-1 или антигенсвязывающие молекулы связывают CLL-1 человека с K_D , составляющей менее чем 1×10^{-8} М. В некоторых вариантах реализации антитело против CLL-1 или антигенсвязывающие молекулы связывают CLL-1 человека с K_D , составляющей приблизительно 1×10^{-7} М, приблизительно 2×10^{-7} М, приблизительно 3×10^{-7} М, приблизительно 4×10^{-7} М, приблизительно 5×10^{-7} М, приблизительно 6×10^{-7} М, приблизительно 7×10^{-7} М, приблизительно 8×10^{-7} М, приблизительно 9×10^{-7} М, приблизительно 1×10^{-8} М, приблизительно 2×10^{-8} М, приблизительно 3×10^{-8} М, приблизительно 4×10^{-8} М, приблизительно 5×10^{-8} М, приблизительно 6×10^{-8} М, приблизительно 7×10^{-8} М, приблизительно 8×10^{-8} М, приблизительно 9×10^{-8} М, приблизительно 1×10^{-9} М, приблизительно 2×10^{-9} М, приблизительно 3×10^{-9} М, приблизительно 4×10^{-9} М, приблизительно 5×10^{-9} М, приблизительно 6×10^{-9} М, приблизительно 7×10^{-9} М, приблизительно 8×10^{-9} М, приблизительно 9×10^{-9} М, приблизительно 1×10^{-10} М или приблизительно 5×10^{-10} М. В некоторых вариантах реализации K_D рассчитывают как отношение k_{off}/k_{on} , и k_{on} и k_{off} определяют с применением моновалентного антитела, такого как фрагмент Fab, как измерено, например, посредством поверхностного плазмонного резонанса с использованием технологии BIAcore®. В других вариантах реализации K_D рассчитывают как отношение k_{off}/k_{on} , и k_{on} и k_{off} определяют с применением бивалентного антитела, такого как фрагмент Fab, как измерено, например, посредством поверхностного плазмонного резонанса с использованием технологии BIAcore®.

В других вариантах реализации антитело против CLL-1 или антигенсвязывающая молекула связывает CLL-1-Fc человека с K_D , составляющей менее чем 1×10^{-9} М, менее чем 3×10^{-9} М, менее чем 5×10^{-9} М, менее чем 1×10^{-10} М, менее чем 3×10^{-10} М или менее чем 5×10^{-10} М. В других вариантах реализации антитело против CLL-1 или антигенсвязывающие молекулы связывают CLL-1-Fc яванского макака с K_D , составляющей менее чем 1×10^{-5} М, менее чем 1×10^{-6} М, менее чем 1×10^{-7} М, менее чем 1×10^{-8} М, менее чем 1×10^{-9} М или менее чем 1×10^{-10} М.

В некоторых вариантах реализации антитело против CLL-1 или антигенсвязывающая молекула связывает CLL-1 человека с константой скорости ассоциации (k_{on}), составляющей менее чем 1×10^4 М⁻¹ с⁻¹, менее чем 2×10^4 М⁻¹ с⁻¹, менее чем 3×10^4 М⁻¹ с⁻¹, менее чем 4×10^4 М⁻¹ с⁻¹, менее чем 5×10^4 М⁻¹ с⁻¹, менее чем 6×10^4 М⁻¹ с⁻¹, менее чем 7×10^4 М⁻¹ с⁻¹, менее чем 8×10^4 М⁻¹ с⁻¹, менее чем 9×10^4 М⁻¹ с⁻¹, менее чем 1×10^5 М⁻¹ с⁻¹, менее чем 2×10^5 М⁻¹ с⁻¹, менее чем 3×10^5 М⁻¹ с⁻¹, менее чем 4×10^5 М⁻¹ с⁻¹, менее чем 5×10^5 М⁻¹ с⁻¹, менее чем 6×10^5 М⁻¹ с⁻¹, менее чем 7×10^5 М⁻¹ с⁻¹, менее чем 8×10^5 М⁻¹ с⁻¹, менее чем 9×10^5 М⁻¹ с⁻¹, менее чем 1×10^6 М⁻¹ с⁻¹, менее чем 2×10^6 М⁻¹ с⁻¹, менее чем 3×10^6 М⁻¹ с⁻¹, менее чем 4×10^6 М⁻¹ с⁻¹, менее чем 5×10^6 М⁻¹ с⁻¹, менее чем 6×10^6 М⁻¹ с⁻¹, менее чем 7×10^6 М⁻¹ с⁻¹, менее чем 8×10^6 М⁻¹ с⁻¹, менее чем 9×10^6 М⁻¹ с⁻¹ или менее чем 1×10^7 М⁻¹ с⁻¹. В некоторых вариантах реализации k_{on} определяют с применением моновалентного антитела, такого как фрагмент Fab, как измерено, например, посредством поверхностного плазмонного резонанса с использованием технологии BIAcore®. В других вариантах реализации k_{on} определяют с применением бивалентного антитела, как измерено, например, посредством поверхностного плазмонного резонанса с использованием технологии BIAcore®.

В некоторых вариантах реализации антитело против CLL-1 или антигенсвязывающая молекула связывает CLL-1 человека с константой скорости диссоциации (k_{off}), составляющей менее чем 1×10^2 с⁻¹, менее чем 2×10^2 с⁻¹, менее чем 3×10^2 с⁻¹, менее чем 4×10^2 с⁻¹, менее чем 5×10^2 с⁻¹, менее чем 6×10^2 с⁻¹, менее чем 7×10^2 с⁻¹, менее чем 8×10^2 с⁻¹, менее чем 9×10^2 с⁻¹, менее чем 1×10^3 с⁻¹, менее чем 2×10^3 с⁻¹, менее чем 3×10^3 с⁻¹, менее чем 4×10^3 с⁻¹, менее чем 5×10^3 с⁻¹, менее чем 6×10^3 с⁻¹, менее чем 7×10^3 с⁻¹, менее чем 8×10^3 с⁻¹, менее чем 9×10^3 с⁻¹, менее чем 1×10^4 с⁻¹, менее чем 2×10^4 с⁻¹, менее чем 3×10^4 с⁻¹, менее чем 4×10^4 с⁻¹, менее чем 5×10^4 с⁻¹, менее чем 6×10^4 с⁻¹, менее чем 7×10^4 с⁻¹, менее чем 8×10^4 с⁻¹, менее чем 9×10^4 с⁻¹, менее чем 1×10^4 с⁻¹ или менее чем 5×10^4 с⁻¹. В некоторых вариантах реализации k_{off} определяют с применением моновалентного антитела, такого как фрагмент Fab, как измерено, например, посредством поверхностного плазмонного резонанса с использованием технологии BIAcore®. В других вариантах реализации k_{off} определяют с применением бивалентного антитела, как измерено, например, посредством поверхностного плазмонного резонанса с использованием технологии BIAcore®.

Антигенсвязывающая молекула называется "селективной", когда она связывается с одной мишенью более прочно, чем со второй мишенью.

Термин "антитело" относится к интактному иммуноглобулину любого изотипа или его фрагменту, который может конкурировать с интактным антителом за специфичное связывание с антигеном-мишенью, и включает, например, химерные, гуманизированные, полностью человеческие и биспецифичные антитела. "Антитело" представляет собой вид антигенсвязывающей молекулы, как определено в настоящем описании. Интактное антитело обычно содержит по меньшей мере две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи, но в некоторых случаях может содержать меньшее количество цепей, как то природные антитела верблюдовых, которые могут содержать только тяжелые цепи. Антитела могут быть получены исключительно из одного источника или могут быть химерными, т.е. различные участки антитела могут быть получены из двух разных антител, как описано ниже. Антигенсвязывающие молекулы, антитела или связывающие фрагменты могут быть получены в гибридомах, с помощью технологии рекомбинантных ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактных антител. Если не указано иное, термин "антитело" включает, помимо антител, содержащих две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи, их производные, варианты, фрагменты и мутантные варианты, примеры которых описаны ниже. Кроме того, если явно не исключено, антитела включают моноклональные антитела, биспецифичные антитела, миниантитела, доменные антитела, синтетические антитела (иногда упоминаемые в настоящем описании как "миметики антител"), химерные антитела, гуманизированные антитела, антитела человека, слитые антитела (иногда упоминаемые в настоящем описании как "конъюгаты антител") и их фрагменты соответственно.

Вариабельные области обычно демонстрируют одну и ту же общую структуру, содержащую относительно консервативные каркасные участки (FR), соединенные тремя гипервариабельными участками (т.е. "CDR"). CDR из двух цепей каждой пары обычно выравниваются каркасными участками, которые могут обеспечить связывание с конкретным эпитопом. Вариабельные области как легкой, так и тяжелой цепи обычно содержат домены, от N-конца к C-концу, FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Принято, что участки CDR в тяжелой цепи обычно называются CDR1, CDR2 и CDR3 HC. Участки CDR в легкой цепи обычно называются CDR1, CDR2 и CDR3 LC. Отнесение аминокислот к каждому домену обычно соответствует определениям по Кабату, Чотиа или определению AbM.

Термин "нумерация по Кабату" и похожие термины являются признанными в данной области техники и относятся к системе нумерации аминокислотных остатков в вариабельных областях тяжелой и легкой цепей антитела или его антигенсвязывающем участке. В некоторых аспектах CDR антитела могут быть определены в соответствии с системой нумерации по Кабату (см., например, Kabat E.A. & Wu T.T. (1971), *Ann. NY Acad. Sci.*, 190:382-391; и Kabat E.A. et al. (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication, № 91-3242). Согласно системе нумерации по Кабату CDR внутри молекулы тяжелой цепи антитела обычно расположены в позициях аминокислот 31-35, которые необязательно могут включать одну или две дополнительные аминокислоты после 35 (называемые в схеме нумерации по Кабату как 35A и 35B) (CDR1), позициях аминокислот 50-65 (CDR2) и позициях аминокислот 95-102 (CDR3). Согласно системе нумерации по Кабату CDR внутри молекулы легкой цепи антитела обычно расположены в позициях аминокислот 24-34 (CDR1), позициях аминокислот 50-56 (CDR2) и позициях аминокислот 89-97 (CDR3). В конкретном варианте реализации CDR антител согласно настоящему описанию были определены в соответствии со схемой нумерации по Кабату.

В некоторых аспектах CDR антитела могут быть определены в соответствии со схемой нумерации по Чотиа, которая относится к расположению структурных петель иммуноглобулинов (см., например, Chothia C. & Lesk A.M. (1987), *J. Mol. Biol.*, 196:901-917; Al-Lazikani B et al. (1997), *J. Mol. Biol.*, 273:927-948; Chothia C. et al. (1992), *J. Mol. Biol.*, 227:799-817; Tramontano A. et al. (1990), *J. Mol. Biol.*, 215(1):175-82; и патент США № 7709226). Как правило, при использовании системы нумерации по Кабату петля CDR-H1 согласно нумерации по Чотиа расположена в позициях аминокислот 26-32, 33 или 34 тяжелой цепи, петля CDR-H2 согласно нумерации по Чотиа расположена в позициях аминокислот 52-56 тяжелой цепи и петля CDR-H3 согласно нумерации по Чотиа расположена в позициях аминокислот 95-102 тяжелой цепи, тогда как петля CDR-L1 согласно нумерации по Чотиа расположена в позициях аминокислот 24-34 легкой цепи, петля CDR-L2 согласно нумерации по Чотиа расположена в позициях аминокислот 50-56 легкой цепи и петля CDR-L3 согласно нумерации по Чотиа расположена в позициях аминокислот 89-97 легкой цепи. Конец петли CDR-H1 согласно нумерации по Чотиа при нумерации с использованием системы нумерации по Кабату варьирует между H32 и H34 в зависимости от длины петли (это объясняется тем, что схема нумерации по Кабату предполагает размещение вставок в позициях H35A и H35B; если и 35A, и 35B отсутствуют, петля заканчивается в позиции 32; если присутствует только 35A, петля заканчивается в позиции 33; если присутствуют и 35A, и 35B, петля заканчивается в позиции 34).

В конкретном варианте реализации CDR антител согласно настоящему описанию были определены в соответствии со схемой нумерации по Чотиа.

Ряд определений CDR является общепринятым: нумерация по Кабату, нумерация по Чотиа, нумерация AbM или контактная нумерация. Определение AbM представляет собой компромисс между пер-

выми двумя и используется программным обеспечением для моделирования антител AbM от Oxford Molecular. Контактное определение основано на анализе имеющихся комплексных кристаллических структур.

Таблица 2

Нумерация CDR

Петля	Кабат	AbM	Чотиа	Контактная
L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
H1	H31--H35B (Нумерация по Кабату)	H26--H35B	H26--H32.34	H30--H35B
H1	H31--H35 (Нумерация по Чотиа)	H26--H35	H26--H32	H30--H35
H2	H50--H65	H50--H58	H52--H56	H47--H58
H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

В настоящем описании термин "тяжелая цепь", используемый в отношении антитела, может относиться к любому отдельному типу, например альфа (α), дельта (δ), эpsilon (ϵ), гамма (γ) и мю (μ), основанному на аминокислотной последовательности константного домена, что обуславливает наличие классов антител IgA, IgD, IgE, IgG и IgM соответственно, включая подклассы IgG, например IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

В настоящем описании термин "легкая цепь", используемый в отношении антитела, может относиться к любому отдельному типу, например каппа (κ) или лямбда (λ), основанному на аминокислотной последовательности константных доменов. Аминокислотные последовательности легкой цепи хорошо известны в данной области техники. В конкретных вариантах реализации легкая цепь представляет собой легкую цепь человека.

Термин "вариабельная область" или "вариабельный домен" относится к участку легкой и/или тяжелой цепей антитела, как правило, содержащему приблизительно от 120 до 130 аминокислот из N-концевой последовательности в тяжелой цепи и приблизительно от 100 до 110 аминокислот из N-концевой последовательности в легкой цепи. Вариабельная область антитела обычно определяет специфичность конкретного антитела к его мишени.

Вариабельность неравномерно распределена по вариабельным доменам антител или антигенсвязывающих молекул; она сосредоточена в субдоменах каждой из вариабельных областей тяжелой и легкой цепей. Эти субдомены называются "гипервариабельными участками" или "участками, определяющими комплементарность" (CDR), как описано далее в настоящем описании. Более консервативные (т.е. не гипервариабельные) участки вариабельных доменов называются "каркасными" участками (FRM или FR), и они обеспечивают каркас для шести CDR в трехмерном пространстве с образованием антигенсвязывающей поверхности. Каждый из вариабельных доменов природных тяжелых и легких цепей содержит четыре участка FRM (FR1, FR2, FR3 и FR4), в основном принимающих конфигурацию β -листа, соединенных тремя гипервариабельными участками, которые образуют петли, соединяющие структуру β -листа и в некоторых случаях образующие ее часть. Гипервариабельные участки в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости за счет FRM и вместе с гипервариабельными участками из другой цепи способствуют образованию антигенсвязывающего сайта (см. Kabat et al.) как описано далее в настоящем описании.

Как правило, CDR образуют структуру петли, которая может быть классифицирована как каноническая структура. Термин "каноническая структура" относится к конформации главной цепи, которую принимают антигенсвязывающие петли (CDR). С помощью сравнительных структурных исследований было обнаружено, что пять из шести антигенсвязывающих петель имеют лишь ограниченный набор доступных конформаций. Каждая каноническая структура может быть охарактеризована торсионными углами полипептидного остова. Таким образом, соответствующие петли разных антител могут иметь очень похожие трехмерные структуры несмотря на высокую вариабельность аминокислотных последовательностей в большинстве участков петель (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 1987, 196:901; Chothia et al., Nature, 1989, 342:877; Martin and Thornton, J. Mol. Biol., 1996, 263:800). Кроме того, существует взаимосвязь между принятой структурой петли и аминокислотными последовательностями ее окружения. Конформация конкретного канонического класса определяется длиной петли и аминокислотными остатками, находящимися в ключевых положениях внутри петли, а также внутри консервативного каркаса (т.е. вне петли). Таким образом, отнесение к конкретному каноническому классу может быть основано на присутствии этих ключевых аминокислотных остатков.

Термин "каноническая структура" также может включать учет особенностей, касающихся линейной

последовательности антитела, например, как в классификации по Кабату (Kabat et al., см. в настоящем описании). Схема (система) нумерации по Кабату представляет собой широко принятый стандарт для единообразной нумерации аминокислотных остатков варибельного домена антитела и является предпочтительной схемой, применяемой в соответствии с настоящим изобретением, что также упоминается в тексте настоящего описания. Дополнительный учет структурных особенностей также может применяться для определения канонической структуры антитела. Например, различия, которые полностью не отражены в нумерации по Кабату, могут быть описаны с помощью системы нумерации по Chothia et al. и/или выявлены посредством других методов, например кристаллографии и двух- или трехмерного компьютерного моделирования. Соответственно данная последовательность антитела может быть отнесена к каноническому классу, который позволяет, помимо прочего, идентифицировать соответствующие блоки последовательностей (например, при необходимости включения в библиотеку множества канонических структур). Нумерация по Кабату аминокислотных последовательностей антител и учет структурных особенностей, описанных Chothia et al. (см. в настоящем описании), и их применения для рассмотрения канонических аспектов структуры антител описаны в литературе. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны в данной области техники. Обзор структуры антител см. в публикации *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow et al., 1988.

CDR3 легкой цепи и особенно CDR3 тяжелой цепи могут составлять наиболее важные детерминанты для связывания антигена внутри варибельных областей легкой и тяжелой цепей. В некоторых конструкциях антител CDR3 тяжелой цепи, по-видимому, составляет основную область контакта между антигеном и антителом. Схемы отбора *in vitro*, согласно которым меняют только CDR3, могут применяться для изменения связывающих свойств антитела или для определения остатков, участвующих в связывании антигена. Следовательно, CDR3, как правило, является самым большим источником молекулярного разнообразия в связывающем сайте антитела. H3, например, может составлять всего два аминокислотных остатка или более чем 26 аминокислот.

В настоящем описании термины "константный участок" и "константный домен" являются взаимозаменяемыми и имеют значение, общепринятое в данной области техники. Константный участок представляет собой участок антитела, например С-концевой участок легкой и/или тяжелой цепей, который непосредственно не участвует в связывании антитела с антигеном, но который может выполнять различные эффекторные функции, такие как взаимодействие с Fc-рецептором. Константный участок молекулы иммуноглобулина обычно содержит более консервативную аминокислотную последовательность по сравнению с варибельным доменом иммуноглобулина.

"Аффинность связывания" в общем относится к силе совокупных нековалентных взаимодействий между отдельным сайтом связывания молекулы (например, антитела) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, в настоящем описании "аффинность связывания" относится к истинной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами пары связывания (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X для ее партнера Y может в общем быть представлена с помощью константы диссоциации (K_D). Аффинность может быть измерена и/или выражена рядом способов, известных в данной области техники, включающих, но не ограничивающихся перечисленными, равновесную константу диссоциации (K_D) и равновесную константу ассоциации (K_A). K_D рассчитывают из отношения k_{off}/k_{on} , тогда как K_A рассчитывают из отношения k_{on}/k_{off} . k_{on} относится к константе скорости ассоциации, например, антитела и антигена, а k_{off} относится к диссоциации, например, антитела и антигена. k_{on} и k_{off} могут быть определены с помощью способов, известных специалисту в данной области техники, таких как анализы VIAcore® или KinExA.

Термин "нейтрализация" относится к антигенсвязывающей молекуле, scFv или антителу соответственно, которые связываются с лигандом и предотвращают или снижают биологический эффект этого лиганда. Это может быть достигнуто, например, путем непосредственного блокирования сайта связывания на лиганде или путем связывания с лигандом и изменения способности лиганда к связыванию посредством косвенных путей (таких как структурные или энергетические изменения в лиганде). В некоторых вариантах реализации указанный термин может также обозначать антигенсвязывающую молекулу, которая предотвращает выполнение биологической функции белка, с которым она связывается.

Термин "мишень" или "антиген" относится к молекуле или участку молекулы, способным быть связанными антигенсвязывающей молекулой. В некоторых вариантах реализации мишень может содержать один или более эпитопов.

Термин "конкурировать" в контексте антигенсвязывающих молекул, которые конкурируют за один и тот же эпитоп, означает конкуренцию между антигенсвязывающими молекулами, как определено посредством анализа, в котором исследуемая антигенсвязывающая молекула (например, антитело или его иммунологически функциональный фрагмент) предотвращает или ингибирует (например, уменьшает) специфичное связывание эталонной антигенсвязывающей молекулы с антигеном. Многочисленные типы конкурентных анализов связывания могут применяться для определения того, конкурирует ли одна антигенсвязывающая молекула с другой, например твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (RIA), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (EIA), конкурентный сэндвич-

анализ (Stahli et al., 1983, *Methods in Enzymology*, 9:242-253); твердофазный прямой EIA с образованием авидин-биотинового комплекса (Kirkland et al., 1986, *J. Immunol.*, 137:3614-3619), твердофазный прямой анализ с применением метки, твердофазный прямой сэндвич-анализ с применением метки (Harlow and Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); твердофазный прямой RIA с применением I-125 в качестве метки (Morel et al., 1988, *Molec. Immunol.*, 25:7-15); твердофазный прямой EIA с образованием авидин-биотинового комплекса (Cheung, et al., 1990, *Virology*, 176:546-552) и прямой RIA с применением метки (Moldenhauer et al., 1990, *Scand. J. Immunol.*, 32:77-82).

В настоящем описании термин "эпитоп" относится к локализованному участку антигена, с которым антитело может специфично связываться. Эпитоп может представлять собой, например, смежные аминокислоты полипептида (линейный или смежный эпитоп), или эпитоп может, например, быть образован двумя или более несмежными участками полипептида или полипептидов (конформационный, нелинейный, прерывистый или несмежный эпитоп). В некоторых вариантах реализации эпитоп, с которым связывается антитело, может быть определен посредством, например, ЯМР-спектроскопии, кристаллографических исследований методом дифракции рентгеновских лучей, анализов ELISA, обмена водорода/дейтерия в сочетании с масс-спектрометрией (например, жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией с ионизацией электрораспылением), сканирующих анализов олигопептидов, основанных на использовании массива данных, и/или картирования с применением мутагенеза (например, картирования с применением сайт-направленного мутагенеза). Для кристаллографии методом дифракции рентгеновских лучей кристаллизация может быть выполнена с применением любого способа, известного в данной области техники (например, Giegé R et al. (1994), *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 50(Pt. 4):339-350; McPherson A. (1990), *Eur. J. Biochem.*, 189:1-23; Chayen N.E. (1997), *Structure* 5:1269-1274; McPherson A. (1976), *J. Biol. Chem.*, 251:6300-6303). Кристаллы антитело:антиген могут быть исследованы с применением хорошо известных методов дифракции рентгеновских лучей, и структуры могут быть уточнены с использованием компьютерного программного обеспечения, такого как X-PLOR (Yale University, 1992, компания-поставщик Molecular Simulations, Inc.; см., например, *Meth Enzymol* (1985), vol. 114 & 115, eds Wyckoff H.W. et al.; US 2004/0014194) и BUSTER (Bricogne G. (1993), *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 49(Pt. 1):37-60; Bricogne G. (1997), *Meth Enzymol*, 276A:361-423, ed Carter C.W.; Roversi P. et al. (2000), *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 56(Pt. 10):1316-1323). Исследования в участках картирования с применением мутагенеза могут быть выполнены любым способом, известным специалисту в данной области техники. См., например, Champe M. et al. (1995), *J. Biol. Chem.*, 270:1388-1394; и Cunningham B.C. & Wells J.A. (1989), *Science*, 244:1081-1085 для описания методов мутагенеза, включая методы аланин-сканирующего мутагенеза.

В настоящем описании термины "метка" или "меченый" относятся к включению детектируемого маркера, например, путем введения радиоактивно меченой аминокислоты или присоединения к полипептиду фрагментов биотина, которые можно детектировать с применением меченого авидина (например стрептавидина, содержащего флуоресцентную метку или имеющего ферментативную активность, которые можно детектировать с помощью оптических или колориметрических методов). В некоторых вариантах реализации метка или маркер также могут быть терапевтическими. Различные способы введения метки в полипептиды и гликопротеины известны и могут применяться в данной области техники.

Способы лечения.

При применении адоптивной иммунотерапии интактные Т-клетки могут быть

- (i) взяты у пациента;
- (ii) генетически сконструированы для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), который связывается с по меньшей мере одним опухолевым антигеном;
- (iii) подвергнуты экспансии *ex vivo* с получением более многочисленной популяции сконструированных Т-клеток; и
- (iv) повторно введены пациенту.

См., например, патенты США № 7741465 и 6319494; Eshhar et al. (*Cancer Immunol.*, см. выше); Krause et al. (см. выше); Finney et al. (см. выше). После того как сконструированные Т-клетки повторно вводят пациенту, они опосредуют иммунный ответ против клеток, экспрессирующих опухолевый антиген. См., например, Krause et al., *J. Exp. Med.*, vol. 188, № 4, 1998 (619-626). Этот иммунный ответ включает секрецию Т-клетками ИЛ-2 и других цитокинов, клональную экспансию Т-клеток, распознающих опухолевый антиген, и опосредованное Т-клетками специфичное уничтожение клеток-мишеней. См. Nombach et al., *Journal of Immunol.*, 167:6123-6131 (2001).

Термин "лимфоцит" в настоящем описании включает натуральные киллеры (NK), Т-клетки или В-клетки. NK-клетки представляют собой тип цитотоксических (клеточно-токсических) лимфоцитов, который является основным компонентом врожденной иммунной системы. NK-клетки отторгают опухоли и инфицированные вирусами клетки. Они функционируют посредством процесса апоптоза или запрограммированной гибели клеток. Они называются "натуральными киллерами", поскольку они не требуют активации для уничтожения клеток. Т-клетки играют важную роль в клеточном иммунитете (без участия антител). Их Т-клеточные рецепторы (TCR) дифференцируют сами клетки от лимфоцитов других типов. Тимус, специализированный орган иммунной системы, в первую очередь отвечает за созревание

Т-клеток. Существует шесть типов Т-клеток, а именно Т-хелперы (например, клетки CD4+), цитотоксические Т-клетки (также известные как ТС, цитотоксические Т-лимфоциты, CTL, Т-киллеры, цитолитические Т-клетки, Т-клетки CD8+ или Т-клетки-киллеры), Т-клетки памяти (i) стволовые клетки памяти T_{SCM}, такие как интактные клетки, представляют собой CD45RO-, CCR7+, CD45RA+, CD62L+ (L-селектин), CD27+, CD28+ и IL-7Rα+, но они также экспрессируют большие количества CD95, IL-2Rβ, CXCR3 и LFA-1 и демонстрируют многочисленные функциональные признаки, характерные для клеток памяти; (ii) центральные клетки памяти T_{CM} экспрессируют L-селектин и CCR7, они секретируют ИЛ-2, но не ИФНγ или ИЛ-4; и (iii) эффекторные клетки памяти T_{EM}, однако, не экспрессируют L-селектин или CCR7, но вырабатывают эффекторные цитокины, такие как ИФНγ и ИЛ-4), регуляторные Т-клетки (Tregs, супрессорные Т-клетки или регуляторные Т-клетки CD4+CD25+), Т-клетки-натуральные киллеры (NKT) и Т-клетки гамма-дельта. С другой стороны, В-клетки играют главную роль в функционировании гуморального иммунитета (с участием антител). Они вырабатывают антитела и антигены и выполняют роль антигенпрезентирующих клеток (АПК) и превращаются в В-клетки памяти после активации посредством взаимодействия с антигеном. У млекопитающих незрелые В-клетки образуются в костном мозге, от которого происходит их название.

Термин "генно-инженерный" или "конструированный" относится к способу модификации генома клетки, включающему, но не ограничивающемуся перечисленными, удаление кодирующего или некодирующего участка или его части или вставку кодирующего участка или его части. В некоторых вариантах реализации модифицированная клетка представляет собой лимфоцит, например Т-клетку, которая может быть получена либо от пациента, либо от донора. Клетка может быть модифицирована для экспрессии экзогенной конструкции, такой как, например, химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR), которую внедряют в геном клетки.

"Иммунный ответ" относится к действию клеток иммунной системы (например, Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, натуральных киллеров (НК), макрофагов, эозинофилов, тучных клеток, дендритных клеток и нейтрофилов) и растворимых макромолекул, вырабатываемых любой из этих клеток или печенью (включая АТ, цитокины и комплемент), которое приводит к избирательному нацеливанию, связыванию, повреждению, разрушению и/или выведению из организма позвоночного инвазивных патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, раковых или других аномальных клеток или, в случае аутоиммунного процесса или патологического воспаления, нормальных клеток или тканей человека.

Термин "иммунотерапия" относится к лечению субъекта, пораженного заболеванием или подверженного риску заражения заболеванием или страдающего рецидивом заболевания, с применением способа, включающего индукцию, усиление, подавление или иную модификацию иммунного ответа. Примеры иммунотерапии включают, но не ограничиваются перечисленными, виды Т-клеточной терапии. Т-клеточная терапия может включать адоптивную Т-клеточную терапию, иммунотерапию с применением лимфоцитов, инфильтрующей опухоли (TIL), аутологичную клеточную терапию, терапию с применением аутологичных конструированных клеток (eACT) и аллогенную трансплантацию Т-клеток. Однако специалист в данной области техники должен признать, что раскрытые в настоящем описании способы модификации повышают эффективность любой терапии с применением трансплантируемых Т-клеток. Примеры Т-клеточной терапии описаны в патентных публикациях США № 2014/0154228 и 2002/0006409, патенте США № 5728388 и международной публикации WO 2008/081035.

Т-клетки, применяемые для иммунотерапии, могут быть получены из любого источника, известного в данной области техники. Например, Т-клетки могут быть получены путем дифференцировки *in vitro* из популяции гемопоэтических стволовых клеток или Т-клетки могут быть получены от субъекта. Т-клетки могут быть получены, например, из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), костного мозга, ткани лимфатических узлов, пуповинной крови, ткани тимуса, ткани из очага инфекции, асцита, плеврального экссудата, ткани селезенки и опухолей. Помимо этого, Т-клетки могут быть получены из одной или более линий Т-клеток, доступных в данной области техники. Т-клетки также могут быть получены из единицы крови, собранной у субъекта, с применением любого количества методик, известных специалисту в данной области техники, таких как разделение с помощью фиколла (FICOLL™) и/или аферез. Дополнительные способы выделения Т-клеток для Т-клеточной терапии раскрыты в патентной публикации США № 2013/0287748, полное содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки.

Термин "терапия с применением аутологичных конструированных клеток", который может быть сокращен как "eACT™", также известный как адоптивный перенос клеток, представляет собой способ, посредством которого собственные Т-клетки пациента собирают и впоследствии генетически изменяют для распознавания и нацеливания на один или более антигенов, экспрессируемых на поверхности одной или более конкретных опухолевых клеток или клеток злокачественных новообразований. Т-клетки могут быть сконструированы для экспрессии, например, химерных антигенных рецепторов (CAR) или Т-клеточного рецептора (TCR). CAR-положительные (+) Т-клетки сконструированы для экспрессии внеклеточного одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv) со специфичностью к конкретному опухолевому антигену, связанного с внутриклеточной сигнальной частью, содержащего по меньшей мере один

костимулирующий домен и по меньшей мере один домен активации. Костимулирующий домен может быть получен из (или соответствовать), например, CD28, а домен активации может быть получен из (или соответствовать), например, CD3 дзета. В некоторых вариантах реализации CAR сконструирован таким образом, что он содержит два, три, четыре или более костимулирующих доменов.

Термин "аутологичный" относится к любому материалу, полученному от того же индивидуума, которому он впоследствии будет введен повторно. Например, способ терапии с применением аутологичных конструированных клеток (eACT™) согласно настоящему описанию включает забор у пациента лимфоцитов, которые затем конструируют для экспрессии, например, конструкции CAR и далее вводят обратно тому же пациенту.

Термин "аллогенный" относится к любому материалу, полученному от одного индивидуума, который затем вводят другому индивидууму того же вида, например, при аллогенной трансплантации Т-клеток.

Следовательно, в некоторых аспектах настоящее изобретение включает способ лечения или предотвращения состояния, связанного с нежелательным и/или повышенным содержанием CLL-1 у пациента, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества по меньшей мере одной выделенной антигенсвязывающей молекулы, CAR или TCR, раскрытых в настоящем описании.

Предложены способы лечения заболеваний или расстройств, включая рак. В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к индукции опосредованного Т-клетками иммунного ответа у субъекта, включающей введение субъекту эффективного количества конструированных иммунных клеток согласно настоящей заявке. В некоторых вариантах реализации опосредованный Т-клетками иммунный ответ направлен против клетки-мишени или клеток-мишеней. В некоторых вариантах реализации конструированная иммунная клетка содержит химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR). В некоторых вариантах реализации клетка-мишень представляет собой опухолевую клетку. В некоторых аспектах настоящее изобретение включает способ лечения или предотвращения злокачественного новообразования, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества по меньшей мере одной выделенной антигенсвязывающей молекулы согласно настоящему описанию. В некоторых аспектах настоящее изобретение включает способ лечения или предотвращения злокачественного новообразования, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества по меньшей мере одной иммунной клетки, где иммунная клетка содержит по меньшей мере один химерный антигенный рецептор, Т-клеточный рецептор и/или выделенную антигенсвязывающую молекулу согласно настоящему описанию.

В некоторых аспектах настоящее изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую по меньшей мере одну антигенсвязывающую молекулу согласно настоящему описанию и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция дополнительно содержит дополнительный активный агент.

Антигенсвязывающие молекулы, CAR, TCR, иммунные клетки и им подобные согласно настоящему изобретению могут применяться для лечения миелоидных заболеваний, включая, но не ограничиваясь перечисленными, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММЛ), ювенильный миеломоноцитарный лейкоз, атипичный хронический миелоидный лейкоз, острый промиелоцитарный лейкоз (ОПЛ), острый монобластный лейкоз, острый эритроидный лейкоз, острый мегакариобластный лейкоз, миелодиспластический синдром (МДС), миелопролиферативное заболевание, миелоидное новообразование, миелоидную саркому, бластическое плазмоцитоидное дендритное клеточное новообразование (BPDCN) или их комбинации. Дополнительные заболевания включают воспалительные и/или аутоиммунные заболевания, такие как ревматоидный артрит, псориаз, аллергия, астма, болезнь Крона, ВЗК, СПК, фибромиалгия, мастоцитоз и целиакия.

Следует понимать, что целевые дозы клеток CAR⁺/CAR-T⁺/TCR⁺ могут составлять 1×10⁶-2×10¹⁰ клеток/кг, предпочтительно 2×10⁶ клеток/кг. Следует понимать, что дозы выше и ниже этого диапазона могут подходить для некоторых субъектов и при необходимости подходящие величины доз могут быть определены лечащим врачом. Кроме того, в соответствии с настоящим изобретением может быть предусмотрено многократное введение клеток.

Также предложены способы уменьшения размера опухоли у субъекта, включающие введение субъекту конструированной клетки согласно настоящему изобретению, где указанная клетка содержит химерный антигенный рецептор, Т-клеточный рецептор или химерный антигенный рецептор на основе Т-клеточного рецептора, содержащие антигенсвязывающую молекулу, которая связывается с антигеном опухоли. В некоторых вариантах реализации субъект имеет солидную опухоль или злокачественное заболевание крови, такое как лимфома или лейкоз. В некоторых вариантах реализации конструированную клетку доставляют в ложе опухоли. В некоторых вариантах реализации рак присутствует в костном мозге субъекта. В некоторых вариантах реализации конструированные клетки представляют собой аутологичные Т-клетки. В некоторых вариантах реализации конструированные клетки представляют собой аллогенные Т-клетки. В некоторых вариантах реализации конструированные клетки представляют собой гетерологичные Т-клетки. В некоторых вариантах реализации конструированные клетки согласно на-

стоящей заявке подвергают трансфекции или трансдукции *in vivo*. В других вариантах реализации сконструированные клетки подвергают трансфекции или трансдукции *ex vivo*. В настоящем описании термин "клетка *in vitro*" относится к любой клетке, культивируемой *ex vivo*. В частности, клетка *in vitro* может включать Т-клетку.

Способы могут дополнительно включать введение одного или более химиотерапевтических агентов. В некоторых вариантах реализации химиотерапевтический агент представляет собой антилимфоцитарный (прекондиционирующий) химиотерапевтический агент. Предпочтительные схемы лечения с целью preconditionирования, как и соответствующие предпочтительные биомаркеры, описаны в предварительных заявках на патент США 62/262143 и 62/167750, полное содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки. В них описаны, например, способы кондиционирования пациента, нуждающегося в Т-клеточной терапии, включающие введение пациенту предпочтительных установленных доз циклофосфида (от 200 до 2000 мг/м²/сутки) и установленных доз флударабина (от 20 до 900 мг/м²/сутки). Предпочтительная схема введения включает лечение пациента, включающее ежедневное введение пациенту приблизительно 500 мг/м²/сутки циклофосфида и приблизительно 60 мг/м²/сутки флударабина в течение трех дней с последующим введением пациенту терапевтически эффективного количества сконструированных Т-клеток.

В других вариантах реализации антигенсвязывающую молекулу, трансдуцированные (или иным образом сконструированные) клетки (такие как CAR или TCR) и химиотерапевтический агент каждый вводят в количестве, эффективном для лечения заболевания или состояния у субъекта.

В некоторых вариантах реализации композиции, содержащие экспрессирующие CAR иммунные эффекторские клетки, раскрытые в настоящем описании, могут быть введены совместно с любым количеством химиотерапевтических агентов. Примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (Цитоксан (CYTOXAN™)); алкилсульфонаты, такие как бусульфид, импросульфид и пипосульфид; азиридины, такие как бензодопа, карбоксон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метилмеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтилендиофосфорамид, триэтилендиофосфорамид и триметилломеламиновая смола; производные азотистого иприта, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтамин оксида гидрохлорид, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трифосфамид, урацил мустард; производные нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как аклациномицины, актиномицин, антрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, калихеамицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубин, деторубин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубин, эпирубицин, эзрубицин, идарубин, марцелломицин, митомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиномицин, пуромидин, квеламицин, родорубин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, циностафин, зорубин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-ФУ); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, энцитабин, флоксурин, 5-ФУ; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестостерон; средства, угнетающие функции надпочечников, такие как аминоглутетимид, митоган, трилостан; средства для восполнения дефицита фолиевой кислоты, такие как фолиевая кислота; ацеглатон; альдофосфамида гликозид; аминоклевулиновую кислоту; амсакрин; бестрабуцил; бисантрон; эдатрексат; дефофамин; демеколцин; диазиковон; эльформитин; эллиптина ацетат; этоглоцид; галлия нитрат; гидроксимочевину; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубин; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK®; разоксан; сизофиран; спирогерманий; тетуазоновую кислоту; триазиковон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ara-C"); циклофосфамид; тиотепа; таксоиды, например, паклитаксел (Таксол (TAXOL™), Bristol-Myers Squibb) и доцетаксел (Таксотер (TAXOTERE®), Rhone-Poulenc Roger); хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; соединения платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платину; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С; митоксантрон; винкрестин; винорелбин; навельбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминокперин; кселоду; ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS2000; дифформетилорнитин (ДФМО); производные ретиноевой кислоты, такие как Таргретин (Targretin™) (бексаротен), Панретин (Panretin™) (алитретинин); Онтак (ONTAK™) (денилейкин дифтитокс); эсперамицины; капецитабин и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанных выше. Также в это определение включены антигормональные агенты, действие которых направлено на регуляцию или подавление действия гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены, включая, например, тамоксифен, ралоксифен, ингибирующие ароматазу 4(5)-имидазолы, 4-гидроксиатамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен (Фарестон (Fareston)); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпорид и гозерелин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого

из указанных выше. Также в случае необходимости вводят комбинации химиотерапевтических агентов, включающие, но не ограничивающиеся перечисленными, комбинацию СНОР, т.е. циклофосфамид (Цитоксан (Cytoxan®)), доксорубин (гидроксидоксорубин), винкристин (Онковин (Oncovin®)) и преднизон.

В некоторых вариантах реализации химиотерапевтический агент вводят одновременно с введением или в течение одной недели после введения конструированной клетки, полипептида или нуклеиновой кислоты. В других вариантах реализации химиотерапевтический агент вводят в период времени от 1 до 4 недель или от 1 недели до 1 месяца, от 1 недели до 2 месяцев, от 1 недели до 3 месяцев, от 1 недели до 6 месяцев, от 1 недели до 9 месяцев или от 1 недели до 12 месяцев после введения конструированной клетки или нуклеиновой кислоты. В других вариантах реализации химиотерапевтический агент вводят по меньшей мере за 1 месяц до введения клетки, полипептида или нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации способы дополнительно включают введение двух или более химиотерапевтических агентов.

Совместно с композициями согласно настоящему описанию могут применяться различные дополнительные терапевтические агенты. Например, потенциально подходящие дополнительные терапевтические агенты включают ингибиторы PD-1, такие как ниволумаб (Опдиво (Opdivo®)), пембролизумаб (Кейтруда (Keytruda®)), пембролизумаб, пидилизумаб и атезолизумаб.

Дополнительные терапевтические агенты, подходящие для применения в комбинации с настоящим изобретением, включают, но не ограничиваются перечисленными, ибрутиниб (Имбрувика (Imbruvica®)), офатумумаб (Арзерра (Arzerra®)), ритуксимаб (Ритуксан (Rituxan®)), бевацизумаб (Авастин (Avastin®)), трастузумаб (Герцептин (Herceptin®)), трастузумаб эмтанзин (Кадсила (KADCYLA®)), иматиниб (Гливек (Gleevec®)), цетуксимаб (Эрбитукс (Erbitux®)), панитумумаб (Вектибикс (Vectibix®)), катумаксомаб, ибритумомаб, офатумумаб, тозитумомаб, брентуксимаб, алемтузумаб, гемтузумаб, эрлотиниб, gefинитиб, вандетаниб, афатиниб, лапатиниб, нератиниб, акситиниб, маситиниб, пазопаниб, сунитиниб, сорафениб, тоцераниб, лестауртиниб, акситиниб, цедираниб, ленватиниб, нинтеданиб, пазопаниб, регорафениб, семаксаниб, сорафениб, сунитиниб, тивозаниб, тоцераниб, вандетаниб, энтректиниб, кабозантиниб, иматиниб, дазатиниб, nilотиниб, понатиниб, радотиниб, бозутиниб, лестауртиниб, руксолитиниб, пакритиниб, кобиметиниб, селуметиниб, траметиниб, биниметиниб, алектиниб, церитиниб, кризотиниб, афлиберцепт, адипотид, денилейкин дифтитокс, ингибиторы mTOR, такие как эверолимус и темсиролиму, ингибиторы сигнального пути Hedgehog, такие как сонидегиб и висмодегиб, ингибиторы CDK, такие как ингибитор CDK (палбоциклиб).

В дополнительных вариантах реализации композиция, содержащая иммунные клетки, содержащие CAR, может быть введена совместно с противовоспалительным агентом. Противовоспалительные агенты или лекарственные средства включают, но не ограничиваются перечисленными, стероиды и глюкокортикоиды (включая бетаметазон, будесонид, дексаметазон, гидрокортизона ацетат, гидрокортизон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизолон, преднизон, триамцинолон), нестероидные противовоспалительные средства (НПВС), включая аспирин, ибупрофен, напроксен, метотрексат, сульфасалазин, лефлуноמיד, лекарственные средства, подавляющие ФНО, циклофосфамид и микофенолат. Типовые НПВС включают ибупрофен, напроксен, напроксена натрий, ингибиторы ЦОГ-2 и салилаты. Типовые анальгетики включают ацетаминофен, оксикодон, трамадол или пропоксифена гидрохлорид. Типовые глюкокортикоиды включают кортизон, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизолон или преднизон. Типовые модификаторы биологического ответа включают молекулы, направленные против маркеров клеточной поверхности (например, CD4, CD5 и т.д.), ингибиторы цитокинов, такие как антагонисты ФНО (например, этанерцепт (Энбрел (ENBREL®)), адалимумаб (Хумира (HUMIRA®)) и инфликсимаб (Ремикейд (REMICADE®)), ингибиторы хемокинов и ингибиторы молекул адгезии. Модификаторы биологического ответа включают моноклональные антитела, а также рекомбинантные формы молекул. Типовые БМАРП включают азатиоприн, циклофосфамид, циклоспорин, метотрексат, пеницилламин, лефлуноמיד, сульфасалазин, гидроксихлорохин, соединения золота (для перорального (ауранофин) и внутримышечного введения) и миноциклин.

В некоторых вариантах реализации композиции согласно настоящему описанию вводят совместно с цитокином. Термин "цитокин" в настоящем описании относится к белкам, высвобождаемым одной клеточной популяцией, которые действуют на другую клетку в качестве медиаторов межклеточных взаимодействий. Примерами цитокинов являются лимфокины, монокины и традиционные полипептидные гормоны. В число цитокинов входят гормоны роста, такие как гормон роста человека, N-метионилированный гормон роста человека и бычий гормон роста; паратиреоидный гормон; тироксин; инсулин; проинсулин; релаксин; прорелаксин; гликопротеиновые гормоны, такие как фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), тиреостимулирующий гормон (ТСГ) и лютеинизирующий гормон (ЛГ); фактор роста гепатоцитов (ФРГ); фактор роста фибробластов (ФРФ); пролактин; плацентарный лактоген; ингибирующее вещество Мюллера; гонадотропин-ассоциированный пептид мыши; ингибин; активин; фактор роста эндотелия сосудов; интегрин; тромбозин (ТПО); факторы роста нервной ткани (NGF), такие как NGF-бета; фактор роста тромбоцитов; трансформирующие факторы роста (ТФР), такие как ТФР-альфа и ТФР-бета;

инсулиноподобный фактор роста-I и -II; эритропоэтин (ЭПО); остеоиндуктивные факторы; интерфероны, такие как интерферон-альфа, -бета и -гамма; колониестимулирующие факторы (КСФ), такие как макрофагальный колониестимулирующий фактор (М-КСФ); гранулоцитарно-макрофагальный КСФ (ГМ-КСФ) и гранулоцитарный КСФ (Г-КСФ); интерлейкины (ИЛ), такие как ИЛ-1, ИЛ-1-альфа, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-15, фактор некроза опухоли, такой как ФНО-альфа или ФНО-бета; и другие полипептидные факторы, включая ЛИФ и лиганд Kit (KL). В настоящем описании термин "цитокин" включает белки, полученные из природных источников или из культуры рекомбинантных клеток, и биологически активные эквиваленты цитокинов с нативной последовательностью.

В некоторых аспектах настоящее изобретение включает антигенсвязывающую молекулу, которая связывается с CLL-1 с K_d , составляющей менее 100 пМ. В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающая молекула связывается с K_d , составляющей менее 10 пМ. В других вариантах реализации антигенсвязывающая молекула связывается с K_d , составляющей менее 5 пМ.

Способы получения.

Для получения полинуклеотидов, полипептидов, векторов, антигенсвязывающих молекул, иммунных клеток, композиций и т.п. согласно настоящему изобретению может применяться множество известных методик.

Иммунные клетки согласно настоящему описанию могут быть получены от субъекта, после чего осуществляют их обработку *in vitro* или генетическую модификацию. В некоторых вариантах реализации иммунные клетки включают Т-клетки. Т-клетки могут быть получены из ряда источников, включая мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, ткань тимуса, ткань из очага инфекции, асцит, плевральный экссудат, ткань селезенки и опухоли. В некоторых вариантах реализации Т-клетки могут быть получены из единицы крови, собранной у субъекта, с применением любого количества методик, известных специалисту в данной области техники, таких как разделение с помощью фиколла (FICOLL™). Предпочтительно клетки могут быть получены из циркулирующей крови субъекта путем афереза. Продукт афереза, как правило, содержит лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядродержащие лейкоциты, эритроциты и тромбоциты. В некоторых вариантах реализации клетки, собранные путем афереза, промывают для удаления фракции плазмы и помещают в подходящий буфер или среду для последующей обработки. Клетки могут быть промыты ФСБ. Следует иметь в виду, что может использоваться стадия промывки, как то с использованием полуавтоматической проточной центрифуги - например, Cobe™ 2991 cell processor, Baxter CytoMate™, или т.п. После промывки клетки могут быть ресуспендированы в различных биосовместимых буферах или другом солевом растворе с буфером или без него. В некоторых вариантах реализации нежелательные компоненты образца, полученного путем афереза, могут быть удалены.

В некоторых вариантах реализации Т-клетки выделяют из МКПК путем лизиса красных клеток крови и обеднения моноцитов, например, с помощью центрифугирования в градиенте перколла (PERCOLL™). Конкретная субпопуляция Т-клеток, такая как Т-клетки $CD28^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD45RA^+$ и $CD45RO^+$, может быть дополнительно выделена с применением методик положительного или отрицательного отбора, известных в данной области техники. Например, обогащение популяции Т-клеток путем отрицательного отбора может быть выполнено с помощью комбинации антител, нацеленных на поверхностные маркеры, уникальные для отбираемых с помощью отрицательного отбора клеток. Одним из применяемых способов является сортировка и/или отбор клеток с помощью отрицательной магнитной иммунной адгезии или проточной цитометрии с применением коктейля моноклональных антител, нацеленных на маркеры клеточной поверхности, присутствующие на отбираемых с помощью отрицательного отбора клетках. Например, для обогащения клетками $CD4^+$ с помощью отрицательного отбора коктейль моноклональных антител, как правило, содержит антитела против CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. Также проточная цитометрия и сортировка клеток могут использоваться для выделения целевых популяций клеток для применения согласно настоящему изобретению.

МКПК могут использоваться непосредственно для генетической модификации иммунных клеток (такой как CAR или TCR) с применением способов согласно настоящему описанию. В некоторых вариантах реализации после выделения МКПК могут быть дополнительно выделены Т-лимфоциты, и как цитотоксические Т-лимфоциты, так и Т-лимфоциты-хелперы могут быть рассортированы с получением субпопуляций интактных Т-клеток, Т-клеток памяти и эффекторных Т-клеток либо до, либо после генетической модификации и/или экспансии.

В некоторых вариантах реализации клетки $CD8^+$ дополнительно сортируют с получением интактных клеток, центральных клеток памяти и эффекторных клеток путем выявления антигенов клеточной поверхности, которые связаны с каждым из этих типов клеток $CD8^+$. В некоторых вариантах реализации экспрессия фенотипических маркеров центральных Т-клеток памяти включает $CD45RO$, $CD62L$, $CCR7$, $CD28$, $CD3$ и $CD127$ и указанные клетки являются отрицательными в отношении гранзима В. В некоторых вариантах реализации центральные Т-клетки памяти представляют собой Т-клетки $CD45RO^+$,

CD62L⁺, CD8⁺. В некоторых вариантах реализации эффекторные Т-клетки являются отрицательными в отношении CD62L, CCR7, CD28 и CD127 и положительными в отношении гранзима В и перфорина. В некоторых вариантах реализации Т-клетки CD4⁺ дополнительно сортируют с получением их субпопуляций. Например, Т-клетки-хелперы CD4⁺ могут быть рассортированы с получением интактных клеток, центральных клеток памяти и эффекторных клеток путем выявления популяций клеток, содержащих антигены клеточной поверхности.

Иммунные клетки, такие как Т-клетки, после выделения могут быть подвергнуты генетической модификации с применением известных способов, или может быть проведена активация и экспансия указанных иммунных клеток (или дифференцировка в случае клеток-предшественников) *in vitro*, а затем их генетическая модификация. В другом варианте реализации иммунные клетки, такие как Т-клетки, подвергаются генетической модификации химерными антигенными рецепторами согласно настоящему описанию (например, трансдукции вирусным вектором, содержащим одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих CAR) и затем активации и/или экспансии *in vitro*. Способы осуществления активации и экспансии Т-клеток известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США № 6905874; патенте США № 6867041; патенте США № 6797514; и публикации PCT WO 2012/079000, полное содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки. В целом такие способы включают приведение МКПК или выделенных Т-клеток в контакт со стимулирующей молекулой и костимулирующей молекулой, такими как антитела против CD3 и против CD28, как правило, присоединенные к частице или другой поверхности, в культуральной среде с подходящими цитокинами, такими как ИЛ-2. Антитела против CD3 и против CD28, присоединенные к одной и той же частице, выступают в качестве "суррогатной" антигенпрезентирующей клетки (АПК). Одним из примеров является система Dynabeads®, система активатора/стимулятора CD3/CD28 для физиологической активации Т-клеток человека. В других вариантах реализации Т-клетки могут быть подвергнуты активации и стимуляции их пролиферации с помощью питающих клеток и подходящих антител и цитокинов с применением таких способов, как способы, описанные в патенте США № 6040177; патенте США № 5827642; и публикации WO 2012129514, полное содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

Некоторые способы получения конструкций и конструированных иммунных клеток согласно настоящему изобретению описаны в заявке PCT US15/14520, полное содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки. Дополнительные способы получения конструкций и клеток приведены в предварительной заявке на патент США № 62/244036, полное содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки.

Следует понимать, что МКПК могут дополнительно включать другие цитотоксические лимфоциты, такие как НК-клетки или НКТ-клетки. Вектор экспрессии, несущий кодирующую последовательность химерного рецептора, раскрытого в настоящем описании, может быть введен в популяцию донорских Т-клеток, НК-клеток или НКТ-клеток человека. Успешно трансдуцированные Т-клетки, несущие вектор экспрессии, могут быть рассортированы с помощью проточной цитометрии для выделения CD3-положительных Т-клеток и затем может быть дополнительно проведено их размножение для увеличения количества этих экспрессирующих CAR Т-клеток наряду с активацией клеток с применением антител против CD3 и ИЛ-2 или других способов, известных в данной области техники, описанных в другой части настоящего описания. Для криоконсервирования экспрессирующих CAR Т-клеток для хранения и/или приготовления для применения у субъекта, являющегося человеком, используют стандартные методики. В одном варианте реализации трансдукцию *in vitro*, культивирование и/или экспансию Т-клеток проводят в отсутствие продуктов, полученных от животных, не являющихся человеком, таких как эмбриональная телячья сыворотка и эмбриональная бычья сыворотка.

Для клонирования полинуклеотидов вектор может быть введен в клетку-хозяина (выделенную клетку-хозяина) для обеспечения репликации самого вектора и, таким образом, увеличения количества копий содержащегося в нем полинуклеотида. Клонирование векторы могут содержать компоненты последовательности, как правило, включающие, но не ограничивающиеся перечисленными, точку начала репликации, промоторные последовательности, последовательности инициации транскрипции, энхансерные последовательности и селективируемые маркеры. Эти элементы могут быть выбраны средним специалистом в данной области техники в зависимости от конкретного случая. Например, точка начала репликации может быть выбрана для обеспечения автономной репликации вектора в клетке-хозяине.

В некоторых вариантах реализации в настоящем описании предложены выделенные клетки-хозяева, содержащие вектор, предложенный в настоящем описании. Клетки-хозяева, содержащие указанный вектор, могут быть пригодны для применения при экспрессии или клонировании полинуклеотида, содержащегося в векторе. Подходящие клетки-хозяева могут включать, но не ограничиваются перечисленными, прокариотические клетки, клетки грибов, дрожжевые клетки или высшие эукариотические клетки, такие как клетки млекопитающих. Подходящие для этой цели прокариотические клетки включают, но не ограничиваются перечисленными, зубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы, например Enterobacteriaceae, такие как Escherichia, например E. coli, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, например Salmonella typhimurium, Serratia, например Serratia mar-

cescans, и Shigella, а также Bacilli, такие как *B. subtilis* и *B. licheniformis*, *Pseudomonas*, такие как *P. aeruginosa*, и *Streptomyces*.

Вектор может быть введен в клетку-хозяина с применением любых подходящих способов, известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь перечисленными, опосредованную ДЭАЭ-декстраном доставку, метод осаждения фосфатом кальция, опосредованную катионными липидами доставку, опосредованную липосомами трансфекцию, электропорацию, бомбардировку микрочастицами, опосредованную рецептором доставку гена, доставку, опосредованную полилизинном, гистонном, хитозаном и пептидами. Стандартные способы трансфекции и трансформации клеток для экспрессии целевого вектора хорошо известны в данной области техники. В еще одном варианте реализации для генетической модификации донорской популяции иммунных эффекторных клеток может применяться смесь различных векторов экспрессии, где каждый вектор кодирует отличный от других CAR, раскрытый в настоящем описании. Полученные трансдуцированные иммунные эффекторные клетки образуют смешанную популяцию конструированных клеток, где часть конструированных клеток экспрессирует более одного различных CAR.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложен способ хранения генетически конструированных клеток, экспрессирующих CAR или TCR, нацеленных на белок CLL-1. Этот способ включает криоконсервирование иммунных клеток таким образом, что клетки остаются жизнеспособными при оттаивании. Часть иммунных клеток, экспрессирующих указанные CAR, могут быть подвергнуты криоконсервированию с применением способов, известных в данной области техники, для обеспечения постоянного источника таких клеток для последующего лечения пациентов, страдающих от злокачественного новообразования. При необходимости подвергнутые криоконсервированию трансформированные иммунные клетки могут быть разморожены, выращены и может быть проведена их экспансия для увеличения количества таких клеток.

В настоящем описании термин "криоконсервирование" относится к обеспечению сохранности клеток путем охлаждения до отрицательных температур, таких как (как правило) 77 градусов Кельвина, или -196°C (точка кипения жидкого азота). Криозащитные агенты часто применяют при отрицательных температурах для предотвращения консервированных клеток от повреждения вследствие замораживания при низких температурах или нагревания до комнатной температуры. Агенты для криоконсервирования и оптимальная скорость охлаждения могут защитить клетку от повреждения. Криозащитные агенты, которые могут применяться согласно настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются перечисленными, диметилсульфоксид (ДМСО) (Lovelock & Bishop, *Nature* (1959), 183:1394-1395; Ashwood-Smith, *Nature* (1961), 190:1204-1205), глицерин, поливинилпирролидин (Rinfret, *Ann. NY Acad. Sci.* (1960), 85:576) и полиэтиленгликоль (Sloviter & Ravdin, *Nature* (1962), 196:48). Предпочтительная скорость охлаждения составляет $1-3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

Термин "по существу чистый" используется для обозначения того, что содержание данного компонента является высоким. Указанный компонент предпочтительно является преобладающим компонентом, присутствующим в композиции. Предпочтительно его содержание составляет более 30%, более 50%, более 75%, более 90% или даже более 95% при определении на основе отношения сухая масса/сухая масса по отношению ко всей рассматриваемой композиции. При очень высоком содержании (например, при содержании более 90%, более 95% и более 99%) компонент можно рассматривать как находящийся в "чистой форме". Биологически активные вещества согласно настоящему изобретению (CAR, TCR, выделенные полипептиды, выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, антигенсвязывающие молекулы, фрагменты) могут быть получены в форме, по существу свободной от одной или более примесей, с которыми указанное вещество может быть связано в других случаях. В случае если композиция по существу свободна от данной примеси, содержание указанной примеси будет низким (например, при содержании менее 10%, менее 5% или менее 1% на основе отношения сухая масса/сухая масса, указанного выше).

В некоторых вариантах реализации клетки готовят, сначала собирая их из их культуральной среды, а затем осуществляя их промывку и концентрирование в среде и контейнерной системе, подходящих для введения ("фармацевтически приемлемый" носитель) в эффективном для лечения количестве. Подходящие среды для инфузий могут представлять собой любой изотонический состав, как правило физиологический раствор, Нормосол Р (NormosolTM R) (Abbott) или Плазма-Лит А (Plasma-LyteTM A) (Baxter), однако также могут применяться 5% декстроза в воде или Рингера лактат. К среде для инфузий может быть добавлен сывороточный альбумин человека.

Требующееся для лечения количество клеток в композиции обычно составляет по меньшей мере 2 клетки (например, подгруппа из по меньшей мере 1 центральной Т-клетки памяти CD8^+ и по меньшей мере 1 Т-клетки-хелпера CD4^+) или более часто более 10^2 клеток и до 10^6 , 10^8 или 10^9 клеток включительно и может составлять более 10^{10} клеток. Количество клеток будет зависеть от желаемого применения, для которого предназначена композиция, и типа содержащихся в ней клеток. Плотность желаемых клеток, как правило, составляет более 10^6 клеток/мл, и обычно составляет более 10^7 клеток/мл, обычно 10^8 клеток/мл или более. Клинически значимое количество иммунных клеток может быть распределено на несколько инфузий, которые в совокупности составляют или превышают 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} ,

10^{11} или 10^{12} клеток. В некоторых аспектах настоящего изобретения, в частности, поскольку все введенные посредством инфузии клетки будут перенацелены (перенаправлены) на конкретный антиген-мишень (CLL-1), могут быть введены меньшие количества клеток, в пределах $10^6/\text{кг}$ (10^6 - 10^{11} на пациента). Средства, содержащие CAR, могут быть многократно введены в дозах, находящихся в пределах этих диапазонов. Клетки могут являться аутологичными, аллогенными или гетерологичными для подвергающегося терапии пациента.

Популяции клеток, экспрессирующих CAR, согласно настоящему изобретению могут быть введены либо отдельно, либо в виде фармацевтической композиции совместно с разбавителями и/или другими компонентами, такими как ИЛ-2 или другие цитокины или популяции клеток. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут содержать популяцию клеток, экспрессирующих CAR или TCR, таких как Т-клетки согласно настоящему описанию, совместно с одним или более фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами. Такие композиции могут содержать буферы, такие как нейтральный забуференный физиологический раствор, забуференный фосфатом физиологический раствор и т.п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА или глутатион; адьюванты (например, гидроксид алюминия) и консерванты. Композиции согласно настоящему изобретению предпочтительно готовят для внутривенного введения.

Фармацевтические композиции (растворы, суспензии или т.п.) могут содержать одно или более из следующего: стерильные разбавители, такие как вода для инъекций, солевой раствор, предпочтительно физиологический раствор; раствор Рингера, изотонический хлорид натрия, нелетучие масла, такие как синтетические моно- или диглицериды, которые могут служить в качестве растворителя или суспендирующей среды, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или гидросульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетатные, цитратные или фосфатные, и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Препарат для парентерального введения может быть заключен в ампулы, шприцы для однократного применения или флаконы для многократного введения из стекла или пластика. Фармацевтическая композиция для инъекционного введения предпочтительно является стерильной.

Следует понимать, что нежелательные явления могут быть сведены к минимуму путем трансдукции иммунных клеток (содержащих один или более CAR или TCR) суицидным геном. Также может требоваться введение в иммунные клетки индуцибельного "включающего" или "ускоряющего" переключателя. Подходящие методики включают использование индуцибельной каспазы-9 (заявка на патент США 2011/0286980) или тимидинкиназы до, после или во время проведения трансдукции клеток конструкцией CAR согласно настоящему изобретению. Дополнительные способы введения суицидных генов и/или "включающих" переключателей включают технологию TALENS, цинковые пальцы, интерферирующую РНК (RNAi), малую интерферирующую РНК (siRNA), малую шпилечную РНК (shRNA), антисмысловую технологию и другие методики, известные в данной области техники.

Согласно настоящему изобретению в настоящее описание могут быть включены дополнительные методики регуляции с помощью переключателя, относящегося к типу "включатель-выключатель" (on-off) или к другим типам. Эти методики могут включать применение доменов димеризации и факультативных активаторов димеризации таких доменов. Эти методики включают, например, методики, включающие применение систем димеризации FKBP/рапалог в некоторых клетках, описанные в источнике Wu et al., Science, 2014, 350 (6258), полное содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки. Дополнительная технология димеризации описана, например, в источнике Fegan et al., Chem. Rev., 2010, 110, 3315-3336, а также патентах США № 5830462; 5834266; 5869337 и 6165787, полное содержание которых также включено в настоящее описание посредством ссылки. Дополнительные пары димеризации могут включать циклоспорин-А/циклофилин, рецептор, эстроген/рецептор эстрогена (необязательно с применением тамоксифена), глюкокортикоиды/рецептор глюкокортикоидов, тетрациклин/рецептор тетрациклина, витамин D/рецептор витамина D. Дополнительные примеры технологии димеризации приведены, например, в WO 2014/127261, WO 2015/090229, US 2014/0286987, US 2015/0266973, US 2016/0046700, патенте США № 8486693, US 2014/0171649 и US 2012/0130076, полное содержание которых также включено в настоящее описание посредством ссылки.

Следует понимать, что описания, используемые в настоящем описании, приведены только в качестве примера и пояснения и не ограничивают заявленное изобретение. В этой заявке использование единственного числа включает множественное число, если специально не указано иное.

Заголовки разделов, используемые в настоящем описании, предназначены только для организационных целей и не должны истолковываться как ограничивающие описанное. Все документы или части документов, приведенные в настоящей заявке, включая, но не ограничиваясь перечисленными, патенты, заявки на патенты, статьи, книги и научные труды, явным образом полностью включены в настоящее описание посредством ссылки для любой цели. В соответствии с настоящим описанием следующие тер-

мины, если не указано иное, следует понимать как имеющие следующие значения:

В настоящей заявке использование "или" означает "и/или", если не указано иное. Кроме того, использование термина "включая", а также других форм, таких как "включает/содержит" и "включенный/содержащийся", не является ограничивающим. Кроме того, такие термины, как "элемент" или "компонент", охватывают как элементы и компоненты, содержащие одну единицу, так и элементы и компоненты, которые содержат более одной субъединицы, если специально не указано иное.

Термин "активность CLL-1" включает любое биологическое действие CLL-1. В некоторых вариантах реализации активность CLL-1 включает способность CLL-1 взаимодействовать или связываться с субстратом или рецептором.

Термин "полинуклеотид", "нуклеотид" или "нуклеиновая кислота" включает как одноцепочечные, так и двухцепочечные полимеры нуклеотидов. Он предпочтительно включает выделенные полинуклеотиды, нуклеотиды или нуклеиновые кислоты, указанные в настоящем описании. Нуклеотиды, из которых состоит полинуклеотид, могут представлять собой рибонуклеотиды, или дезоксирибонуклеотиды, или модифицированную форму любого типа нуклеотида. Указанные модификации включают модификации основания, такие как производные бромуредина и инозина, модификации рибозы, такие как 2',3'-дидезоксирибоза, и модификации межнуклеотидных связей, такие как фосфоротиоат, фосфороди-тиоат, фосфороселеноат, фосфородиселеноат, фосфоранилотиоат, фосфораниладат и фосфорамидат.

Термин "олигонуклеотид" относится к полинуклеотиду, содержащему 200 или менее нуклеотидов. Олигонуклеотиды могут быть одноцепочечными или двухцепочечными, например, для применения при конструировании мутантного гена. Олигонуклеотиды могут представлять собой смысловые или анти-смысловые олигонуклеотиды. Олигонуклеотид может содержать метку, включая радиоактивную метку, флюоресцентную метку, гаптен или антигенную метку для анализа с целью выявления. Олигонуклеотиды могут использоваться, например, в качестве праймеров для ПЦР, праймеров для клонирования или гибридизационных зондов.

Термин "регуляторная последовательность" относится к полинуклеотидной последовательности, которая может оказывать влияние на экспрессию и процессинг кодирующих последовательностей, с которыми она лигирована. Характер таких регуляторных последовательностей может зависеть от организма-хозяина. В конкретных вариантах реализации регуляторные последовательности для прокариот могут содержать промотор, сайт связывания рибосом и последовательность терминации транскрипции. Например, регуляторные последовательности для эукариот могут содержать промоторы, содержащие один или множество сайтов распознавания для факторов транскрипции, последовательности энхансеров транскрипции, последовательность терминации транскрипции. "Регуляторные последовательности" могут содержать лидерные последовательности (сигнальные пептиды) и/или последовательности партнеров по слиянию.

В некоторых вариантах реализации полинуклеотид согласно настоящему изобретению, кодирующий CAR или TCR, может дополнительно содержать лидерную последовательность или лидерный пептид (также упоминаемый в настоящем описании как "сигнальный пептид"). В некоторых вариантах реализации лидерный пептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности MALPVTALLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 144). В некоторых вариантах реализации лидерный пептид содержит аминокислотную последовательность, представляющую собой SEQ ID NO: 144.

В настоящем описании термин "функционально связанный" означает, что компоненты, к которым применяется этот термин, взаимосвязаны таким образом, что это позволяет им выполнять присущие им функции в подходящих условиях.

Термин "вектор" означает любую молекулу или объект (например, нуклеиновую кислоту, плазмиду, бактериофаг или вирус), используемые для переноса информации, кодирующей белок, в клетку-хозяина. Термин "вектор экспрессии" или "конструкция экспрессии" относится к вектору, который подходит для трансформации клетки-хозяина и содержит последовательности нуклеиновых кислот, которые направляют и/или регулируют (совместно с клеткой-хозяином) экспрессию одного или более гетерологичных кодирующих участков, функционально связанных с ними.

Конструкция экспрессии может содержать, но не ограничивается перечисленными, последовательности, которые влияют на транскрипцию, трансляцию или регулируют их, и, если присутствуют интроны, влияют на сплайсинг РНК кодирующего участка, функционально связанного с ними.

Термин "клетка-хозяин" относится к клетке, которая была трансформирована или способна подвергаться трансформации с применением последовательности нуклеиновой кислоты и вследствие этого экспрессирует целевой ген. Термин включает потомство родительской клетки независимо от того, идентично ли потомство исходной родительской клетке по морфологии или набору генов, при условии, что присутствует целевой ген.

Термин "трансформация" относится к изменению генетических характеристик клетки, и клетка яв-

ляется трансформированной, если она была модифицирована таким образом, что содержит новую ДНК или РНК. Например, клетка является трансформированной в случае, когда она генетически модифицирована по отношению к ее нативному состоянию путем введения нового генетического материала посредством трансфекции, трансдукции или других методик. После трансфекции или трансдукции трансформирующая ДНК может рекомбинировать с ДНК клетки путем физического встраивания в хромосому клетки, или может временно удерживаться в качестве эписомального элемента, не подвергаясь репликации, или может независимо реплицироваться в качестве плазмиды. Считается, что клетка "стабильно трансформирована", когда трансформирующая ДНК реплицируется при делении клетки.

Термин "трансфекция" относится к поглощению чужеродной или экзогенной ДНК клеткой. Ряд способов трансфекции хорошо известен в данной области техники и раскрыт в настоящем описании. См., например, Graham et al., 1973, *Virology*, 52:456; Sambrook et al., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, выше; Davis et al., 1986, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier; Chu et al., 1981, *Gene* 13:197.

Термин "трансдукция" относится к процессу, посредством которого чужеродную ДНК вводят в клетку с помощью вирусного вектора. См. Jones et al. (1998), *Genetics: principles and analysis*. Boston: Jones & Bartlett Publ.

Термины "полипептид" или "белок" относятся к макромолекуле, содержащей аминокислотную последовательность белка, включая делеции, вставки и/или замены одной или более аминокислот нативной последовательности, и предпочтительно содержащей не более 8 аминокислотных замен. Предпочтительно полипептиды или белки выделяют, как указано в настоящем описании. Термины "полипептид" и "белок", в частности, охватывают антигенсвязывающие молекулы CLL-1, антитела или последовательности, которые содержат делеции, вставки и/или замены одной или более аминокислот антигенсвязывающего белка, и предпочтительно содержат не более 8 аминокислотных замен. Термин "фрагмент полипептида" относится к выделенному полипептиду, который содержит аминоконцевую делецию, карбоксиконцевую делецию и/или внутреннюю делецию по сравнению с полноразмерным нативным белком. Такие фрагменты также могут содержать модифицированные аминокислоты по сравнению с нативным белком. Подходящие фрагменты полипептидов включают иммунологически функциональные фрагменты антигенсвязывающих молекул. Подходящие фрагменты включают, но не ограничиваются перечисленными, один или более участков CDR, вариабельные домены тяжелой и/или легкой цепей, часть других частей цепи антитела и т.п.

Термин "выделенный" означает

(i) свободный от по меньшей мере некоторых других белков, совместно с которыми он обычно встречается;

(ii) по существу свободный от других белков из того же источника, например из того же вида;

(iii) отделенный от по меньшей мере приблизительно 50% полинуклеотидов, липидов, углеводов или других веществ, с которыми он связан в природе;

(iv) функционально связанный (путем ковалентного или нековалентного взаимодействия) с полипептидом, с которым он не связан в природе; или

(v) не встречается в природе.

"Вариант" полипептида (например, антигенсвязывающей молекулы или антитела) содержит аминокислотную последовательность, причем в указанной аминокислотной последовательности один или более аминокислотных остатков вставлены, исключены и/или заменены относительно другой полипептидной последовательности. Варианты включают гибридные белки.

Термин "идентичность" относится к сходству последовательностей двух или более молекул полипептида или двух или более молекул нуклеиновой кислоты, что определяют путем выравнивания и сравнения последовательностей. "Процент идентичности" означает процент идентичных остатков между аминокислотами или нуклеотидами в сравниваемых молекулах и рассчитывается на основе размера наименьшей из сравниваемых молекул. Для этих вычислений пропуски (gaps) в выравниваемых участках (при наличии) предпочтительно вводят с помощью конкретной математической модели или компьютерной программы (т.е. "алгоритма").

Для расчета процента идентичности сравниваемые последовательности, как правило, выравнивают таким образом, чтобы получить наибольшее совпадение между последовательностями. Одним из примеров компьютерной программы, которая может использоваться для определения процента идентичности, является пакет программ GCG, который включает GAP (Devereux et al., 1984, *Nucl. Acid. Res.* 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.). Компьютерный алгоритм GAP используется для выравнивания двух полипептидов или полинуклеотидов, для которых необходимо определить процент идентичности последовательностей. Последовательности выравнивают для получения оптимального совпадения их соответствующих аминокислот или нуклеотидов ("длина совпадения", определяемая алгоритмом). В некоторых вариантах реализации алгоритм использует также стандартную матрицу сравнения (см. Dayhoff et al., 1978, *Atlas of Protein Sequence and Structure*, 5:345-352 для матрицы сравнения PAM 250; Henikoff et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89:10915-10919 для матрицы сравнения BLOSUM 62).

В настоящем описании двадцать стандартных (например, встречающихся в природе) аминокислот и их сокращенных обозначений используются обычным образом. См. источник Immunology - A Synthesis (2nd Edition, Golub and Gren, Eds., Sinauer Assoc, Sunderland, Mass. (1991)), содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки для любой цели. Стереоизомеры (например, D-аминокислоты) двадцати стандартных аминокислот, не встречающиеся в природе аминокислоты, такие как альфа-, альфа-дизамещенные аминокислоты, N-алкиламинокислоты, молочная кислота и другие нестандартные аминокислоты, также могут быть подходящими компонентами для полипептидов согласно настоящему изобретению. Примеры нестандартных аминокислот включают 4-гидроксипролин, гамма-карбоксиглутамат, эпсилон-N,N,N-триметиллизин, е-N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин, сигма-N-метиларгинин и другие подобные аминокислоты и иминокислоты (например, 4-гидроксипролин). В используемой в настоящем описании форме представления полипептидов направление влево представляет собой направление к аминоконцу, а направление вправо представляет собой направление к карбоксиконцу в соответствии со стандартным использованием и общепринятыми правилами.

Консервативные аминокислотные замены могут охватывать не встречающиеся в природе аминокислотные остатки, которые, как правило, вводят путем химического синтеза пептидов, а не путем синтеза в биологических системах. Они включают пептидомиметики и другие обращенные и инвертированные формы фрагментов аминокислот. Встречающиеся в природе остатки могут быть разделены на классы на основании общих свойств боковой цепи:

- a) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- b) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- c) кислые: Asp, Glu;
- d) основные: His, Lys, Arg;
- e) остатки, которые влияют на ориентацию цепей: Gly, Pro; и
- f) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Например, неконсервативные замены могут включать замену членом одного из этих классов члена из другого класса. Такие замещенные остатки могут быть введены, например, в участки антитела человека, гомологичные антителам других видов, или в негомологичные участки молекулы. Типичные аминокислотные замены приведены в табл. 3.

Таблица 3

<u>Исходный остаток</u>	<u>Типичные замены</u>	<u>Предпочтительные замены</u>
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, норлейцин	Leu
Leu	Норлейцин, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4-диаминомасляная кислота, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr

Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe,	Leu
	Ala, норлейцин	

Термин "производное" относится к молекуле, которая содержит химическую модификацию, отличную от вставки, делеции или замены аминокислот (или нуклеиновых кислот). В некоторых вариантах реализации производные содержат ковалентные модификации, включая, но не ограничиваясь перечисленными, образование химических связей с полимерами, липидами или другими органическими или неорганическими фрагментами. В некоторых вариантах реализации химически модифицированная антигенсвязывающая молекула может иметь больший период полувыведения из кровотока, чем антигенсвязывающая молекула, которая не подвергалась химической модификации. В некоторых вариантах реализации производное антигенсвязывающей молекулы подвергают ковалентной модификации с добавлением одного или более водорастворимых полимеров, включая, но не ограничиваясь перечисленными, полиэтиленгликоль, полиоксиэтиленгликоль или полипропиленгликоль.

Аналоги пептидов обычно применяют в фармацевтической промышленности в качестве непептидных лекарственных средств со свойствами, аналогичными свойствам матричного пептида. Эти типы непептидных соединений называют "миметиками пептидов" или "пептидомиметиками". Источники: Fauchere, J., *Adv. Drug Res.*, 15:29 (1986); Veber & Freidinger, *TINS*, p. 392 (1985); и Evans et al., *J. Med. Chem.*, 30:1229 (1987), содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки для любой цели.

"Терапевтически эффективное количество", "эффективная доза", "эффективное количество" или "терапевтически эффективная доза" терапевтического агента, например конструированных Т-клеток, экспрессирующих CAR, представляет собой любое количество, которое при применении отдельно или в комбинации с другим терапевтическим агентом защищает субъекта от начала заболевания или способствует обращению развития заболевания, о чем свидетельствует снижение тяжести симптомов заболевания, увеличение частоты и продолжительности периодов без проявления симптомов заболевания или предотвращение ухудшения или инвалидизации вследствие вызванных заболеванием поражений. Способность терапевтического агента способствовать обращению развития заболевания может быть оценена с применением различных способов, известных практикующему специалисту, таких как оценка у людей в процессе клинических испытаний, у животных в модельных системах, прогнозирующих эффективность у людей, или оценка путем определения активности агента в анализах *in vitro*.

Термины "пациент" и "субъект" используются взаимозаменяемо и включают субъектов: людей и животных, не являющихся людьми, а также лиц с официально диагностированными расстройствами, лиц без официально установленных расстройств, лиц, получающих медицинскую помощь, лиц, подверженных риску развития расстройств и т.д.

Термин "лечить" и "лечение" включает терапевтическое лечение, профилактическое лечение и применение, при котором снижается риск того, что у субъекта будет развиваться расстройство, или другой фактор риска. Лечение не требует полного устранения расстройства и охватывает варианты реализации, при которых происходит уменьшение симптомов или основных факторов риска. Термин "предотвращать" не требует 100% исключения возможности события. Скорее, это означает, что вероятность возникновения события снижена при применении соединения или способа.

Для получения рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов и культивирования и трансформации тканей могут применяться стандартные методики (например, электропорация, липофекция). Ферментативные реакции и методики очистки могут быть выполнены в соответствии с инструкциями производителя, или обычным образом, принятым в данной области техники, или согласно настоящему описанию. Вышеупомянутые методики и процедуры, как правило, могут быть выполнены в соответствии с общепринятыми способами, хорошо известными в данной области техники и описанными в различных общих и более конкретных источниках, цитируемых и обсуждаемых в настоящем описании. См., например, источник Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки для любой цели.

Включение посредством ссылки.

Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящее описание посредством ссылки в той же степени, как если бы для каждой отдельной публикации, патента или патентной заявки было специально и независимо указано, что они включены посредством ссылки. Однако указание источника в настоящем описании не должно быть истолковано как подтверждение того, что такой источник является частью предшествующего уровня техники по отношению к настоящему изобретению. В тех случаях, когда любое из определений или терминов, представленных в источниках, включенных посредством ссылки, отличается от терминов и обсуждений, представленных в

настоящем описании, предпочтение следует отдавать терминам и определениям, представленным в настоящем описании.

Предполагается, что приведенное выше описание является достаточным для того, чтобы обеспечить специалисту в данной области техники возможность осуществить настоящее изобретение. В приведенном выше описании и примерах подробно описаны некоторые предпочтительные варианты реализации настоящего изобретения и описан лучший вариант, предложенный авторами изобретения. Однако следует понимать, что независимо от того, насколько подробно приведенное выше изложено в тексте, настоящее изобретение может быть осуществлено различными способами и должно быть истолковано в соответствии с прилагаемой формулой изобретения и любыми ее эквивалентами.

Следующие примеры, включая проведенные эксперименты и полученные результаты, приведены только для иллюстративных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие настоящее изобретение.

Пример 1. Определение активности CAR CLL-1 путем электропорации мРНК в МКПК человека.

Плазмиды, кодирующие промотор T7, конструкцию CAR и стабилизирующую последовательность бета-глобина, лиnearизировали путем расщепления 10 мкг ДНК с помощью EcoRI и BamHI (NEB) в течение ночи. Затем ДНК подвергали расщеплению под действием протеиназы K (Thermo Fisher™, 600 ед./мл) в течение 2 ч при 50°C, очищали с помощью смеси фенол/хлороформ и осаждали путем добавления ацетата натрия и двух объемов этанола. Затем осадки сушили, ресуспендировали в воде, не содержащей ДНКаз/РНКаз, и проводили количественное определение. Затем 1 мкг линейной ДНК использовали для проведения транскрипции *in vitro* с помощью mMESSAGING mMACHINE T7 Ultra (ThermoFisher™) в соответствии с инструкциями производителя. РНК дополнительно очищали с помощью набора MEGA-Clear (ThermoFisher™) в соответствии с инструкциями производителя и количественно определяли с помощью NanoDrop™. Целостность мРНК оценивали на основании подвижности в агарозном геле.

Различные линии раковых клеток оценивали в отношении экспрессии CLL-1. Клетки Namalwa (ATCC), U937 (ATCC), HL-60 (ATCC), EoL-1 (Sigma), KG1a (ATCC) и MV4;11 (ATCC) окрашивали антителом против CLL-1, конъюгированным сPE (BD Pharmingen™), в буфере для окрашивания (BD Pharmingen™) в течение 30 мин при 4°C. Затем клетки промывали и ресуспендировали в буфере для окрашивания с пропидия иодидом (BD Pharmingen™), после чего проводили сбор данных. Затем образцы подвергали проточной цитометрии и проводили анализ данных и построение гистограмм с помощью FlowJo™. Результаты для экспрессии CLL-1 показаны на фиг. 1.

МКПК выделяли из лейкопаков (leukopaks) (Hemacare™) здоровых доноров путем центрифугирования в градиенте плотности фиколл-пака в соответствии с инструкциями производителя. МКПК стимулировали с помощью ОКТ3 (50 нг/мл, Miltenyi Biotec™) в среде R10+ИЛ-2 (300 МЕ/мл, Proleukin®, Prometheus® Therapeutics and Diagnostics). Через 7 дней после стимуляции Т-клетки дважды промывали в Opti-MEM™ (Thermo Fisher Scientific™) и ресуспендировали в конечной концентрации $2,5 \times 10^7$ клеток/мл в Opti-MEM. Для электропорации использовали 10 мкг мРНК. Электропорацию клеток проводили с помощью системы Gemini X2 (Harvard Apparatus VTXTM), настроенной для подачи одного импульса 400 В в течение 0,5 мс в кюветках с зазором 2 мм (Harvard Apparatus VTXTM). Клетки сразу переносили в среду R10+ИЛ-2 и оставляли для восстановления. Концентрацию клеток поддерживали в диапазоне $0,5-2,0 \times 10^6$ клеток/мл, затем их использовали для определения активности.

Через 6 ч после электропорации мРНК Т-клетки окрашивали с помощью биотинилированного белка L (Thermo Scientific™) в буфере для окрашивания (BD Pharmingen™) в течение 30 мин при 4°C. Затем клетки промывали и окрашивали с помощью реагента PE Streptavidin (BD Pharmingen™) в буфере для окрашивания в течение 30 мин при 4°C. Затем клетки промывали и ресуспендировали в буфере для окрашивания с пропидия иодидом (BD Pharmingen™), после чего проводили сбор данных. Результаты по выявлению CAR показаны на фиг. 2.

Через 6 ч после электропорации мРНК эффекторные клетки культивировали совместно с клетками-мишенями при отношении Э:М 1:1 в среде R10. Исследуемые линии клеток включали Namalwa, U937, HL-60, EoL-1, KG1a и MV4;11. После совместного культивирования в течение 16 ч супернатанты анализировали с помощью Luminex (EMD Millipore) в соответствии с инструкциями производителя и оценивали жизнеспособность клеток-мишеней с помощью проточного цитометрического анализа захвата пропидия иодида (ПИ). Результаты анализа высвобождения цитокинов показаны на фиг. 3. Результаты анализа цитолитической активности показаны на фиг. 4 и 5.

Пример 2. Определение активности CAR CLL-1 путем лентивирусной трансдукции МКПК человека.

Для получения лентивирусных супернатантов использовали лентивирусный вектор переноса третьего поколения, содержащий различные конструкции CAR CLL-1, в сочетании со смесью ViraPower™ Lentiviral Packaging Mix (Life Technologies™). Кратко, смесь для трансфекции получали путем смешивания 15 мкг ДНК и 22,5 мкл полиэтиленimina (Polysciences™, 1 мг/мл) в 600 мкл среды OptiMEM™. Полученную смесь инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Одновременно клетки 293T

(АТСС) подвергали трипсинолизу, подсчитывали и клетки общим количеством 10×10^6 высевали во флакон Т75 со смесью для трансфекции. Через 3 дня после трансфекции супернатанты собирали и фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и хранили при -80°C до использования.

МКПК выделяли из лейкопаков (Nemacare™) здоровых доноров путем центрифугирования в градиенте плотности фиколл-пака в соответствии с инструкциями производителя. МКПК стимулировали с помощью ОКТ3 (50 нг/мл, Miltenyi Biotec™) в среде R10+ИЛ-2 (300 МЕ/мл, Proleukin®, Prometheus® Therapeutics and Diagnostics). Через 48 ч после стимуляции клетки подвергали трансдукции с помощью лентивируса при множественности заражения (MOI)=10. Концентрацию клеток поддерживали в диапазоне $0,5-2,0 \times 10^6$ клеток/мл, затем их использовали для определения активности.

На 12 день после стимуляции Т-клетки окрашивали с помощью биотинилированного белка L (Thermo Scientific™) в буфере для окрашивания (BD Pharmingen™) в течение 30 мин при 4°C . Затем клетки промывали и окрашивали с помощью реагента PE Streptavidin (BD Pharmingen™) в буфере для окрашивания в течение 30 мин при 4°C . Затем клетки промывали и ресуспендировали в буфере для окрашивания с пропидия иодидом (BD Pharmingen™), после чего проводили сбор данных. Результаты по выявлению CAR показаны на фиг. 6.

Через 12 дней после стимуляции Т-клеток эффекторные клетки культивировали с клетками-мишенями при отношении Э:М 1:1 в среде R10. Исследуемые линии клеток включали Namalwa, U937, HL-60, EoL-1, KG1a и MV4;11. После совместного культивирования в течение 16 ч супернатанты анализировали с помощью Luminescence (EMD Millipore™) в соответствии с инструкциями производителя и оценивали жизнеспособность клеток-мишеней с помощью проточного цитометрического анализа захвата пропидия иодида (ПИ). Результаты анализа высвобождения цитокинов показаны на фиг. 7. Результаты анализа цитолитической активности показаны на фиг. 8.

Пример 3.

В этом исследовании использовали самок мышей Jackson NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) в возрасте 5-6 недель. Мыши получали облученный корм для грызунов Harlan 2918.15 и воду ad libitum. Мышей размещали в одноразовой вентилируемой клетке Innovive™ с подстилкой из стержной початков кукурузы внутри чистых зон Biobubble®, которые обеспечивают поступление воздуха, фильтрованного с помощью H.E.P.A., в ограниченное пространство при полной замене воздуха 100 раз в час. Все воздействия, определение массы тела и измерение опухолей проводили в ограниченном пространстве. Условия среды поддерживали в диапазоне температур $70 \pm 2^\circ\text{F}$ и диапазоне влажности 30-70%. Все процедуры проводили в соответствии со всеми законами, положениями и рекомендациями Национальных институтов здравоохранения (НИН) и с разрешения Комитета по содержанию и использованию животных Molecular Imaging, Inc.

Получение опухолевых клеток.

Клетки U937-luc получали в растворе для хранения Lifer®. Клетки центрифугировали при 200 об/мин в течение 8 мин при 4°C , супернатант удаляли аспирацией и осадок ресуспендировали пипетированием в охлажденном фосфатно-солевом буфере Дульбекко (DPBS). Аликвоту гомогенной суспензии клеток разбавляли в растворе трипанового синего и подсчитывали клетки с помощью автоматического счетчика клеток Luna™. Суспензию клеток центрифугировали при 200 об/мин в течение 8 мин при 4°C . Супернатант удаляли аспирацией и осадок клеток ресуспендировали в охлажденной бессывороточной среде для получения конечной концентрации вытесняющих трипановый синий клеток/мл. Во время имплантации суспензию клеток помещали на водный лед. В 0 день исследуемым животным имплантировали $1,00\text{E}+06$ клеток в объеме 0,2 мл путем внутривенного введения через латеральную хвостовую вену с использованием иглы 27 калибра по шкале Гейдж и шприца.

Получение Т-клеток, экспрессирующих CAR.

Т-клетки согласно настоящему изобретению получали, замораживали на сухом льду и хранили в жидком азоте. В день лечения полученные криопробирки вынимали из криохранилища и размораживали на водяной бане при 37°C . Для каждой группы полученные Т-клетки объединяли в одной конической пробирке объемом 50 мл с нагретой RPMI 1640 с добавлением 10% ЭБС. Криопробирки промывали нагретой RPMI 1640 с 10% ЭБС для минимизации потери клеток до достижения общего объема 50 мл в каждой конической пробирке. Каждую коническую пробирку объемом 50 мл центрифугировали при 200 об/мин в течение 8 мин при 4°C . Супернатанты удаляли аспирацией и осадки клеток ресуспендировали в 10 мл DPBS комнатной температуры. Аликвоту гомогенной суспензии клеток разбавляли в растворе трипанового синего и подсчитывали клетки вручную с помощью гемоцитометра. Суспензии клеток повторно центрифугировали при 200 об/мин в течение 8 мин при 4°C . Супернатанты удаляли аспирацией и осадки клеток ресуспендировали в DPBS комнатной температуры для получения требуемых конечных концентраций. Во время введения препарата суспензию клеток помещали на водный лед.

Биолюминесцентная визуализация.

Биолюминесцентную визуализацию in vivo (BLI) проводили с помощью системы IVIS Spectrum (Perkin Elmer, Hopkinton, MA). Одновременно получали изображения до 5 животных под газовой анестезией с применением ~1-2% изофлурана. Каждой мышце вводили 150 мг/кг (15 мг/мл) D-люциферина пу-

тем в/в инъекции и через 10 мин после инъекции получали изображения в положении лежа на животе, а затем в положении лежа на спине. Использовали значения биннинга ПЗС-матрицы от больших до малых, а время экспозиции регулировали (от 2 с до 2 мин) для получения по меньшей мере нескольких сотен импульсов на изображение, а также во избежание насыщения ПЗС-матрицы. Изображения BLI собирали на 3, 11, 18 и 25 дни. Изображения анализировали с помощью программного обеспечения Living Image версии 4.5 (Perkin Elmer, Hopkinton, MA). Области интереса (ROI) фиксированного объема всего тела помещали на изображения в положении лежа на животе и в положении лежа на спине для каждого отдельного животного и помечали на основании идентификации животных. Для облегчения анализа между группами для всех ROI рассчитывали и экспортировали общее излучение, выраженное в фотонах/с (p/s). Для оценки опухолевой нагрузки всего тела суммировали ROI изображений в положении лежа на животе и в положении лежа на спине.

Лечение.

Все мыши были разделены на исследуемые группы на основании полученной методом биоломисцентной визуализации (BLI) оценки опухолевой нагрузки всего тела. Мышей распределяли таким образом, чтобы средняя опухолевая нагрузка для всех групп находилась в пределах 10% от общей средней опухолевой нагрузки для исследуемой популяции. Лечение с применением Т-клеток, экспрессирующих CAR, начинали на 3 день. Всем мышам вводили фиксированный объем, составляющий 0,2 мл. Результаты приведены на фиг. 10.

Оценка побочных эффектов.

У всех животных определяли клинические признаки по меньшей мере один раз в день. Животных взвешивали в каждый день лечения. Конкретные значения массы тела регистрировали 3 раза в неделю.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими последовательностями.

ДНК внеклеточного, трансмембранного, внутриклеточного доменов

CD28T

CTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAACAATCATTCACGTGAAGGG
CAAGCACCTCTGTCCGTCACCCCTTGTCCCTGGTCCATCCAAGCCA
TTCTGGGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGAGTCCCTCGCTTGTTACTCTC
TGCTCGTCACCGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTTAGATCCAAAAG
AAGCCGCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCG
CCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAG
AGATTCGCTGCCTATCGGAGC (SEQ ID NO. 1)

АК внеклеточного, трансмембранного, внутриклеточного доменов

CD28T

LDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFVVLVVVGGVLACYSL
VTVAFIWFVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFA
AYRS (SEQ ID NO. 2)

ДНК внеклеточного домена CD28T

CTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAACAATCATTCACGTGAAGGG
CAAGCACCTCTGTCCGTCACCCCTTGTCCCTGGTCCATCCAAGCCA
(SEQ ID NO. 3)

АК внеклеточного домена CD28Т

LDNEKSNGTI IHVKGKHLCP SPLFPGPSKP (SEQ ID NO. 4)

ДНК трансмембранного домена CD28

TTCTGGGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGAGTCCTCGCTTGTTACTCTC
TGCTCGTCACCGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTT (SEQ ID NO. 5)

АК трансмембранного домена CD28

FVWLVVVGGV LACYSLLVTV AFIFWV (SEQ ID NO. 6)

ДНК внутриклеточного домена CD28

AGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATG
ACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTAC
GCACCACCTAGAGATTTGCTGCCTATCGGAGC (SEQ ID NO. 7)

АК внутриклеточного домена CD28

RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID
NO. 8)

ДНК CD3 дзета

AGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAG
GGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGA
AGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGA
TGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAACCCCAGGAGGGTCTCTAT
AATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAAT
AGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGT
TTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCT
CTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGG (SEQ ID NO. 9)

АК CD3 дзета

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM
GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLY
QGLSTATKDTYDALHMQUALPPR (SEQ ID NO. 10)

АК варианта CD3 дзета

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM
GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLY
QGLSTATKDTYDALHMQUALPPR (SEQ ID NO. 146)

ДНК CD28

ATTGAGGTGATGTATCCACCGCCTTACCTGGATAACGAAAAGAGT
AACGGTACCATCATTACGTGAAAGGTAAACACCTGTGTCCTTCT
CCCCTCTCCCCGGGCCATCAAAGCCC (SEQ ID NO. 11)

АК CD28

IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKP (SEQ ID NO.

ДНК внеклеточного и трансмембранного доменов CD8

GCTGCAGCATTGAGCAACTCAATAATGTATTTTAGTCACTTTGTAC
CAGTGTCTTGCCGGCTAAGCCTACTACCACACCCGCTCCACGGC
CACCTACCCAGCTCCTACCATCGCTTCACAGCCTCTGTCCCTGCG
CCCAGAGGCTTGCCGACCGGCCGAGGGGGCGCTGTTCATAACAG
AGGACTGGATTTGCGCTGCGATATCTATATCTGGGCACCCCTGGC
CGGAACCTGCGGCGTACTCCTGCTGTCCCTGGTCATCACGCTCTAT
TGTAATCACAGGAAC (SEQ ID NO. 13)

АК внеклеточного и трансмембранного доменов CD8

AAALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA
CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN
(SEQ ID NO. 14)

ДНК НС для клона 24C1

CAGGTGCAGCTGCAGGAATCCGGACCGGGGCTGGTGAAGCCCAG
CGAGACTCTGAGTCTCACGTGTACAGTTTCTGGAGGTAGCATTAG
CTCCTACTATTGGTCATGGATAAGGCAGCCCCCGGAAGGGATT
GGAATGGATCGGCTATATTTACTACAGTGGGAGCACCAATTACAA
CCCCTCACTGAAGTCTAGAGTTACAATCAGCGTTGACACCTCAA
GAATCAGTTCAGTTTGAATTGTCTAGCGTCACAGCAGCTGATAC
AGCCGTCTATTATTGTGTTTCTCTGGTCTATTGCGGTGGGGATTGT

TACAGTGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTGGTTACAGTT
TCTTCC (SEQ ID NO. 15)

АК HC для клона 24C1 (CDR отмечены подчеркиванием)

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWI
GY
IYYSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCVSL
VYCGGDCYSGFDYWGQGLTVVSS (SEQ ID NO. 16)

АК CDR1 HC для клона 24C1: GGSISSY (SEQ ID NO. 17)

АК CDR2 HC для клона 24C1: YYSGS (SEQ ID NO. 18)

АК CDR3 HC для клона 24C1: LVYCGGDCYS GFDY (SEQ ID NO.

ДНК LC для клона 24C1

GACATCCAGTTGACACAGAGCCCGAGTTCCTTGTCGCTCCGTC
GGGGATAGAGTGTCAATTTACCTGTCAGGCCTCTCAGGATATTAAT
AACTTTCTGAATTGGTATCAGCAAAAGCCCGAAAGGCACCCAAG
CTGTTGATTTACGACGCCAGTAACCTGGAGACAGGCGTGCCCTCC
CGGTTTAGTGGTAGCGGAAGCGGTACGGATTTACCTTTACTATC
AGCTCTCTCCAACCCGAAGACATTGCAACCTACTATTGTCAACAA
TATGGAAACCTGCCTTTTACATTTGGCGGCGGCACCAAGGTGGAG
ATTAAGCGG (SEQ ID NO. 20)

АК LC для клона 24C1 (CDR отмечены подчеркиванием)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVSFTCQASQDINNFLN^{WY}QKPGKAPKLLI
YDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTF^{TISS}LQPEDIATYYCQYGNLPFT
FGGGTKVEIKR (SEQ ID NO. 21)

АК CDR1 LC для клона 24C1: QASQDINNFLN (SEQ ID NO. 22)

АК CDR2 LC для клона 24C1: DASNLET (SEQ ID NO. 23)

АК CDR3 LC для клона 24C1: QYGNLPFT (SEQ ID NO. 24)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD28T CD3 дзета для клона 24C1

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCC
TGCACGCCGCACGCCCGCAGGTCCAAGTCAAGAAAGCGGACCC
GGACTGGTGAAGCCTTCTGAGACACTTAGTCTGACGTGCACGGTC
AGTGGCGGCTCCATCTCCTCTATTATTGGTCATGGATACGACAA
CCCCAGGTAAGGGCCTGGAATGGATTGGCTATATCTACTATTCA
GGAAGCACGAACTACAATCCCAGCCTGAAGTCCCAGTGACAATT
TCAGTAGATACCAGTAAAAACCAGTTCAGTCTTAAACTGTCAAGC
GTGACAGCTGCCGACACCGCTGTGTATTACTGCGTCTCACTGGTG
TATTGTGGAGGGGATTGTTATAGCGGGTTCGATTATTGGGGACAG
GGAACCCTGGTACTGTATCTTCCGGCGGCGGCGGCTCAGGGGGT
GGCGGTAGTGGCGGTGGGGTTCCGATATTCAACTGACACAATCC
CCCAGCTCACTCAGCGCCAGCGTGGGGGACAGGGTTAGCTTTACC
TGCAAGCCTCTCAGGATATAAATAACTTTCTGAACTGGTATCAA
CAGAAGCCTGGGAAGGCGCCAACTCCTGATCTATGATGCGTCC
AACCTGGAAGTGGCGTGCCTTACGCTTTAGCGGCTCTGGCAGT
GGTACAGACTTCACTTTTACCATCTCTCACTTCAGCCGGAGGACA
TCGCCACATATTACTGTCAACAGTACGGAACTTGCCCTTTACTTT
TGGAGGCGGCACCAAAGTTGAAATCAAAGGGCCGCTGCCCTGG
ATAACGAAAAGAGCAATGGGACTATAATACATGTTAAAGGAAAA
CACCTGTGTCCATCTCCCCTGTCCCTGGACCGTCAAAGCCATTTT
GGGTGCTCGTGGTTGTCCGTGGCGTTCTCGCCTGTTATAGCTTGCT
GGTACAGTAGCCTTCATTATCTTTGGGTGAGATCCAAAAGAAG
CCGCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCC
TGGCCCCACAAGGAAACTACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGA
TTTCGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGA
TGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCT
CAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCA
GAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAAC
CCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCT
GAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGG
AAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGA
AGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGGT
AA (SEQ ID NO. 25)

АК тяжелой и легкой цепей CAR CD28T CD3 дзета для клона 24C1

(Сигнальный пептид выделен **жирным шрифтом**)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGS
 YSSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYSGSTNYPNPSLKSRTISVDT
 SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCVSLVYCGGDCYSGFDYWGGQTLV
 TVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRVSFTCQASQDI
 NNFLNWIYQKPKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFFTISS
 LQPEDIATYYCQYGNLPFTFGGGTKVEIKRAAALDNEKSNGTIIHV
 KGKHLCPSPFLPSPKPFVVLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFWVRSK
 RSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSA
 DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKN
 PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGLYQGLSTATK
 DTYDA LHMQUALPPR (SEQ ID NO. 26)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD28T CD3 дзета для клона 24C1

CAGGTCCAAGTCAAGAAAGCGGACCCGGACTGGTGAAGCCTTCT
 GAGACACTTAGTCTGACGTGCACGGTCAGTGGCGGCTCCATCTCC
 TCCTATTATTGGTCATGGATACGACAACCCCAAGGTAAGGGCCTG
 GAATGGATTGGCTATATCTACTATTCAGGAAGCACGAAGTACAAT
 CCCAGCCTGAAGTCCCGAGTGACAATTCAGTAGATACCAGTAAA
 AACCAGTTCAGTCTTAAACTGTCAAGCGTGACAGCTGCCGACACC
 GCTGTGTATTACTGCGTCTCACTGGTGTATTGTGGAGGGGATTGTT
 ATAGCGGGTTCGATTATTGGGGACAGGGAACCCTGGTGAAGTGTAT
 CTCCGGCGGCGGGCGGCTCAGGGGGTGGCGGTAGTGGCGGTGGG
 GGTTCGATATTCAACTGACACAATCCCCAGCTCACTCAGCGCC
 AGCGTGGGGGACAGGGTTAGCTTACCTGTCAAGCCTCTCAGGAT
 ATAAATAACTTTCTGAACTGGTATCAACAGAAGCCTGGGAAGGCG
 CCCAAACTCCTGATCTATGATGCGTCCAACCTGGAAACTGGCGTG
 CCTTACGCTTTAGCGGCTCTGGCAGTGGTACAGACTTCACTTTTA
 CCATCTCTCACTTCAGCCGAGGACATCGCCACATATTACTGTCA
 ACAGTACGGAAACTTGCCCTTTACTTTTGGAGGGCGCACCAAAGT
 TGAAATCAAAAGGGCCGCTGCCCTGGATAACGAAAAGAGCAATG
 GGACTATAATACATGTTAAAGGAAAACACCTGTGTCCATCTCCCC
 TGTTCCCTGGACCGTCAAAGCCATTTTGGGTGCTCGTGGTTGTCGG

TGGCGTTCTCGCCTGTTATAGCTTGCTGGTGACAGTAGCCTTCATT
 ATCTTTTGGGTGAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGAT
 TACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACAC
 TACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTCGCTGCCTATCGGAGC
 AGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAG
 GGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGA
 AGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGA
 TGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCCCAGGAGGGTCTCTAT
 AATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAAT
 AGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGCACGACGGT
 TTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCT
 TCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGG (SEQ ID NO. 27)

АК тяжелой и легкой цепей CAR CD28Т CD3 дзета для клона 24С1

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWI
 GYIYYSGSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC
 VSLVYCGGDCYSGFDYWQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ
 LTQSPSSLSASVGDVRSFTFCASQDINNFLNWFYQKPGKAPKLLIYD
 ASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQYGNLPFTFG
 GGTKVEIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPKPFVVLV
 VVGGVLACYLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRK
 HYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRRE
 EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG
 MKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR (SEQ ID NO.
 28)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD28 CD3 дзета для клона 24С1

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCC
 TGCACGCCGCACGCCCGCAGGTGCAGCTGCAGGAATCCCGACCG
 GGGCTGGTGAAGCCAGCGAGACTCTGAGTCTCACGTGTACAGTT
 TCTGGAGGTAGCATTAGCTCCTACTATTGGTCATGGATAAGGCAG
 CCCCCGGGAAGGATTGGAATGGATCGGCTATATTTACTACAGT
 GGGAGACCAATTACAACCCCTCACTGAAGTCTAGAGTTACAATC
 AGCGTTGACACCTCAAAGAATCAGTTCAGTTTCAAATTGTCTAGC

GTCACAGCAGCTGATACAGCCGTCTATTATTGTGTTTCTCTGGTCT
ATTGCGGTGGGGATTGTTACAGTGGCTTTGACTATTGGGGGCAGG
GTA CTCTGGTTACAGTTTCTTCCGGGGGGGAGGCTCTGGGGGCG
GAGGCTCAGGTGGTGGAGGCAGCGACATCCAGTTGACACAGAGC
CCGAGTTCCTTGTCCGCCTCCGTCGGGGATAGAGTGTCATTTACCT
GTCAGGCCTCTCAGGATATTAATAACTTTCTGAATTGGTATCAGC
AAAAGCCCGGAAAGGCACCCAAGCTGTTGATTTACGACGCCAGT
AACCTGGAGACAGGCGTGCCCTCCCGGTTTAGTGGTAGCGGAAGC
GGTACGGATTTTACCTTTACTATCAGCTCTCTCCAACCCGAAGACA
TTGCAACCTACTATTGTCAACAATATGGAAACCTGCCTTTTACATT
TGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATTAAGCGGGCGGCAGCTATTG
AGGTGATGTATCCACCGCCTTACCTGGATAACGAAAAGAGTAACG
GTACCATCATTACGTGAAAGGTAAACACCTGTGTCCTTCTCCCCT
CTTCCCCGGGCCATCAAAGCCCTTCTGGGTTCTTGTGGTCGTGGGA
GGCGTGCTTGCTTGTTATTCTCTGCTCGTTACCGTGGCGTTTATCA
TTTTTTGGGTTAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATT
ACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACT
ACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCA
GGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGG
GCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAA
GAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGAT
GGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCCCAAGGAGGGTCTCTATA
ATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATA
GGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTT
TGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTC
TCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGGTAA (SEQ ID NO. 29)

AK тяжелой и легкой цепей CAR CD28 CD3 дзета для клона 24C1

(Сигнальный пептид выделен **жирным шрифтом**)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQESGPELVKPSSETLSLTCTV
SGSISYYWSWIRQPPGKLEWIGYIYSGSTNYPNPSLKSRTISVDT
SKNQFSLKLSVTAADTAVYYCVSLVYCGGDCYSGFDYWGQGLV
TVSSGGGSGGGSGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDVRSFTCQASQDI
NNFLNWFYQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFISS

LQPEDIATYYCQYGNLPFTFGGGTKVEIKRAAAIEVMYPPPYLDNE
KSNGTIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFVWLVVVGGVLACYSSLVTVA
FIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
RVKFSRSADAPAYQGGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEM
GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLY
QGLSTATKDTYDALHMQUALPPR (SEQ ID NO. 30)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD28 CD3 дзета для клона 24C1

CAGGTGCAGCTGCAGGAATCCGGACCGGGGCTGGTGAAGCCCAG
CGAGACTCTGAGTCTCACGTGTACAGTTTCTGGAGGTAGCATTAG
CTCCTACTATTGGTCATGGATAAGGCAGCCCCCGGGAAGGGATT
GGAATGGATCGGCTATATTTACTACAGTGGGAGCACCAATTACAA
CCCCTCACTGAAGTCTAGAGTTACAATCAGCGTTGACACCTCAA
GAATCAGTTCAGTTTAAAATTGTCTAGCGTCACAGCAGCTGATAC
AGCCGTCTATTATTGTGTTTCTCTGGTCTATTGCGGTGGGGATTGT
TACAGTGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTGGTTACAGTT
TCTTCCGGGGGGGAGGCTCTGGGGGCGGAGGCTCAGGTGGTGG
AGGCAGCGACATCCAGTTGACACAGAGCCCAGTTTCTTGTCCGC
CTCCGTCGGGGATAGAGTGCATTTACCTGTCAGGCCTCTCAGGA
TATTAATAACTTTCTGAATTGGTATCAGCAAAAAGCCCGGAAAGGC
ACCCAAGCTGTTGATTTACGACGCCAGTAACCTGGAGACAGGCGT
GCCCTCCCGGTTTAGTGGTAGCGGAAGCGGTACGGATTTTACCTT
TACTATCAGCTCTCTCAACCCGAAGACATTGCAACCTACTATTGT
CAACAATATGGAAACCTGCCTTTTACATTTGGCGGCGGCACCAAG
GTGGAGATTAAGCGGGCGGCAGCTATTGAGGTGATGTATCCACCG
CCTTACCTGGATAACGAAAAGAGTAACGGTACCATCATTACGTTG
AAAGGTAAACACCTGTGTCCTTCTCCCCTCTTCCCCGGGCCATCAA
AGCCCTTCTGGGTTCTTGTGGTTCGTGGGAGGCGTGCTTGCTTGTA
TTCTCTGCTCGTTACCGTGGCGTTTATCATTTTTTGGGTTAGATCC
AAAAGAAGCCGCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCA
CGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACTACCAGCCTTACGCACCA
CCTAGAGATTTGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGA
TCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTAT
AACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGA

CAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGAC
 GAAAAAACCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGAT
 AAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCG
 GAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCA
 CTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGC
 CACCTAGG (SEQ ID NO. 31)

АК тяжелой и легкой цепей CAR CD28 CD3 дзета для клона 24C1

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWI
 GYIYYSGSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYC
 VSLVYCGGDCYSGFDYWGGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQ
 LTQSPSSLSASVGDVRSFTFCQASQDINNFLNWXQQKPKAPKLLIYD
 ASNLETGVPSRFSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQYGNLPFTFG
 GGTKEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNQTHVKGKHLCPSPFP
 SKPFWLVVVGGVLAACYLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMT
 PRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGNQLY
 NELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK
 MAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLST
 ATKDITYDALHMQALPPR (SEQ ID NO. 32)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD8 CD3 дзета для клона 24C1

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCCGTGGCATTGCTCC
 TGCACGCCGACGCCGAGGTGCAATTGCAAGAGTCCGGCCCCG
 GACTCGTTAAACCCAGTGAGACGCTTAGCCTGACCTGTACCGTCT
 CAGGGGGCAGCATCTCCTTATTACTGGAGCTGGATCAGGCAGC
 CTCCAGGAAAAGGCCTTGAATGGATTGGGTACATCTACTACTCTG
 GCTCAACAAATTATAATCCATCCCTGAAGTCCCAGCTGACTATCT
 CTGTGGACACCAGCAAGAATCAGTTTTCACTGAAGTTGTCTAGTG
 TTACCGCGGCCGACACCGCGTATACTACTGTGTGTCTCTTGTGTA
 CTGTGGCGGCGACTGCTATTCCGGGTTGACTACTGGGGCCAAGG
 GACTCTGGTAACCGTGTCTCAGGCGGCGGGGTGAGGAGGAG
 GCGGCAGTGGAGGTGGCGCTCCGACATCCAGCTGACACAATCA
 CCATCTTCCCTTTCAGCTTCAGTCGGGGACAGAGTGTCTTACAT
 GCCAGGCCAGCCAGGATATCAATAACTTCTGAACTGGTACCAAC

AGAAACCCGGAAAGGCTCCAAAGCTCCTGATCTATGATGCTTCCA
 ACCTGGAGACCCGGCGTGCCCTCCAGGTTTCAGTGGTTCAGGATCAG
 GCACTGACTTTACGTTACCATATCCAGTCTTCAGCCCGAAGACA
 TTGCAACCTATTACTGCCAACAATACGGGAACCTTCCCTTTACATT
 CGGAGGCGGCACCAAGGTGGAAATCAAAAGGGCTGCAGCATTGA
 GCAACTCAATAATGTATTTTAGTCACTTTGTACCAGTGTCTTGCC
 GGCTAAGCCTACTACCACACCCGCTCCACGGCCACCTACCCCAGC
 TCCTACCATCGCTCACAGCCTCTGTCCCTGCGCCAGAGGCTTGC
 CGACCGGCCGACGGGGCGCTGTTCCATACCAGAGGACTGGATTTCC
 GCCTGCGATATCTATATCTGGGCACCCCTGGCCGGAACCTGCGGC
 GTACTCCTGCTGTCCCTGGTCATCACGCTCTATTGTAATCACAGGA
 ACAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATA
 TGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTT
 ACGCACCACTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGT
 TTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACC
 AACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGAC
 GTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAA
 ACCAAGACGAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGC
 AGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAA
 GGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGG
 ACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCA
 AGCCCTGCCACCTAGGTAA (SEQ ID NO. 33)

AK тяжелой и легкой цепей CAR CD8 CD3 дзета для клона 24C1

(Сигнальный пептид выделен **жирным шрифтом**)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLQESGPELVKPSSETLSLTCTVS
 GGSISSYYWSWIRQPPGKLEWIGYIYSGSTNYNPSLKSRTISVDT
 SKNQFSLKLSVTAADTAVYYCVSLVYCGGDCYSGFDYWGQGLV
 TVSSGGGSGGGGSGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRVSFTCQASQDI
 NNFLNWFYQKPKGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGGTDFTFTISS
 LQPEDIATYYCQYGNLPFTFGGGTKVEIKRAAALSNSIMYFSHFVPV
 FLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA
 CDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLLHSDYMNMTF
 RRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYN

ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM
 AEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
 (SEQ ID NO. 34)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD8 CD3 дзета для клона 24C1

CAGGTGCAATTGCAAGAGTCCGGCCCCGACTCGTTAAACCCAGT
 GAGACGCTTAGCCTGACCTGTACCGTCTCAGGGGGCAGCATCTCC
 TCTTATTACTGGAGCTGGATCAGGCAGCCTCCAGGAAAAGCCTT
 GAATGGATTGGGTACATCTACTACTCTGGCTCAACAAATTATAAT
 CCATCCCTGAAGTCCCGCTGACTATCTCTGTGGACACCAGCAAG
 AATCAGTTTTACTGAAGTTGTCTAGTGTTACCGCGGCCGACACC
 GCCGTATACTACTGTGTGTCTCTTGTGTACTGTGGCGGCGACTGCT
 ATTCCGGGTTCCGACTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTAACCGTGT
 CCTCAGGCGGCGGGTTCAGGAGGAGGCGGCAGTGGAGGTGGC
 GGCTCCGACATCCAGCTGACACAATCACCATCTTCCCTTTCAGCTT
 CAGTCGGGGACAGAGTGTCCCTTACATGCCAGGCCAGCCAGGATA
 TCAATAACTTCCGAACTGGTACCAACAGAAACCCGGAAAGGCTC
 CAAAGCTCCTGATCTATGATGCTTCCAACCTGGAGACCGGCGTGC
 CCTCCAGGTTTCAGTGGTTCAGGATCAGGCACTGACTTTACGTTC
 CCATATCCAGTCTTACGCCGAAGACATTGCAACCTATTACTGCC
 AACAAACGGGAACCTTCCCTTTACATTCGGAGGCGGCACCAAGG
 TGGAAATCAAAAAGGGCTGCAGCATTGAGCAACTCAATAATGTATT
 TTAGTCACTTTGTACCAGTGTCTTGCCGGCTAAGCCTACTACCAC
 ACCCGCTCCACGGCCACCTACCCAGCTCCTACCATCGCTTCACA
 GCCTCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCTTGCCGACCGGCCGCAGGGGG
 CGCTGTTCCATACCAGAGGACTGGATTTGCGCTGCGATATCTATATC
 TGGGCACCCCTGGCCGGAACCTGCGGCGTACTCCTGCTGTCCCTG
 GTCATCACGCTCTATTGTAATCACAGGAACAGATCCAAAAGAAGC
 CGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCT
 GGCCCCACAAGGAAACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGAT
 TTCGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGAT
 GCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCT
 CAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCA
 GAGGACGGGACCCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAAC

CCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCT
GAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGG
AAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGA
AGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGG
(SEQ ID NO. 35)

АК тяжелой и легкой цепей CAR CD8 CD3 дзета для клона 24C1

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWI
GYIYYSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYC
VSLVYCGGDCYSGFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ
LTQSPSSLSASVGDVRSFTCQASQDINNFLNWFYQKPKGKAPKLLIYD
ASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQYGNLPFTFG
GGTKVEIKRAAALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTAS
QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCGVLLLSLVI
TLYCNHRNRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAA
YRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDP
EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDG
LYQGLSTATK DTYDALHMQUALPPR (SEQ ID NO. 36)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD28T CD3 дзета для клона 24C1

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCC
TGCACGCCGACGCCGGATATCCAGCTCACGCAATCCCCCTCAA
GCTTGAGTGCCCTCCGTGGGCGACCGGGTGCCTTCACATGTCAGG
CAAGCCAAGACATAAATAATTTCTGAATTGGTACCAACAAAAAC
CCGGCAAGGCTCCCAAACCTGATTTATGATGCCTCCAATCTGG
AGACCGGGGTCCCTTCTAGATTCAGCGGAAGTGGCAGCGGCACA
GACTTTACATTTACTATCTTCTCTGCAACCAGAGGACATCGCCA
CATACTATTGCCAGCAATACGGCAATCTGCCCTTACCTTCGGAG
GCGGAACCAAGGTAGAAATTAAGGGGGCGGTGGAGGCTCCGGA
GGGGGGGGCTCTGGCGGAGGGGGCTCCCAAGTACAATTGCAGGA
GTCAGGGCCTGGACTCGTGAAGCCTTCAGAACTTTGTCACTGAC
ATGTACAGTGTCCGCGGAAGCATTTCAGTACTATTGGTCCTG
GATTAGACAGCCACCCGGCAAAGGACTGGAATGGATTGGATATA
TCTACTACTCTGGATCTACAAACTATAATCCCAGCCTCAAATCCA

GGGTCACTATTAGTGTGGATACATCAAAGAATCAGTTCTCCTTGA
 AGCTGAGCTCAGTCACTGCTGCCGACACCGCAGTGTACTATTGTG
 TGAGCCTGGTCTACTGCGGCGGAGATTGCTACAGCGGTTTCGATT
 ACTGGGGCCAGGGCACCTGGTTACCGTTAGTTCCGCGGCTGCTC
 TTGATAACGAGAAGTCCAACGGTACGATTATCCACGTAAAGGGTA
 AGCACCTTTGCCCTAGCCCCTGTTCCCAGGCCCCAGTAAGCCCTT
 TTGGGTCTCTCGTTGTGGTAGGTGGGGTACTCGCCTGCTACTCCCTG
 CTCGTCCTGTCGCATTCATCATCTTCTGGGTCAGATCCAAAAGA
 AGCCGCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGC
 CCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGA
 GATTTTCGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTTCCAGATCTGCA
 GATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGA
 GCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGC
 GCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAA
 AACCCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGAT
 GGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAA
 GGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGACTCAGCACTGCT
 ACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCT
 AGGTAA (SEQ ID NO. 37)

АК тяжелой и легкой цепей CAR CD28T CD3 дзета для клона 24C1

(Сигнальный пептид выделен **жирным шрифтом**)

MALPVTALLPLALLHAARPDIQLTQSPSSLSASVGDRVSFTCQAS
 QDINNFLNWYQKPKGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTF
 TISSLPEDIATYYCQYGNLPFTFGGGTKVEIKRGGGSGGGSGG
 GGSVQLQESGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGL
 EWIGYIYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVY
 YCVSLVYCGGDCYSGFDYWGQGLVTVSSAAALDNEKSNGTIIHVK
 GKHLCPSPFPGPSKPFVVLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFWVRSKRS
 RLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADA
 PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQ
 EGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDLQGLSTATKDT
 YDA LHMQUALPPR (SEQ ID NO. 38)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD28T CD3 дзета для клона 24C1

GATATCCAGCTCACGCAATCCCCCTCAAGCTTGAGTGCCTCCGTG
GGCGACCGGGTGTCTTTCACATGTCAGGCAAGCCAAGACATAAAT
AATTTCTGAATTGGTACCAACAACAAAAACCCGGCAAGGCTCCAAA
CTCCTGATTTATGATGCCTCCAATCTGGAGACCGGGGTCCCTTCTA
GATTCAGCGGAAGTGGCAGCGGCACAGACTTTACATTTACTATCT
CTTCTCTGCAACCAGAGGACATCGCCACATACTATTGCCAGCAAT
ACGGCAATCTGCCCTTACCTTCGGAGGCGGAACCAAGGTAGAAA
TAAAAGGGGCGGTGGAGGCTCCGGAGGGGGGGGCTCTGGCGGA
GGGGGCTCCCAAGTACAATTGCAGGAGTCAGGGCCTGGACTCGTG
AAGCCTTCAGAAACTTTGTCACTGACATGTACAGTGTCCGGCGGA
AGCATTTCCAGTTACTATTGGTCCTGGATTAGACAGCCACCCGGC
AAAGGACTGGAATGGATTGGATATATCTACTACTCTGGATCTACA
AACTATAATCCCAGCCTCAAATCCAGGGTCACTATTAGTGTGGAT
ACATCAAAGAATCAGTTCTCCTTGAAGCTGAGCTCAGTCACTGCT
GCCGACACCGCAGTGTACTATTGTGTGAGCCTGGTCTACTGCGGC
GGAGATTGCTACAGCGTTTCGATTACTGGGGCCAGGGCACCCCTG
GTTACCGTTAGTTCGCGGCTGCTCTTGATAACGAGAAGTCCAAC
GGTACGATTATCCACGTTAAGGGTAAGCACCTTTGCCCTAGCCCG
CTGTTCCCAGGCCCCAGTAAGCCCTTTTGGGTCTCGTTGTGGTAG
GTGGGGTACTCGCCTGCTACTCCCTGCTCGTCACTGTCTGCATTCAT
CATCTTCTGGGTGAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGA
TTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACA
CTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTGCTGCCTATCGGAG
CAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCA
GGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGG
AAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAG
ATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCCCAAGGAGGGTCTCTA
TAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAAT
AGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGAAAAGGGCACGACGGT
TTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCT
CTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGG (SEQ ID NO. 39)

АК тяжелой и легкой цепей CAR CD28T CD3 дзета для клона 24C1

DIQLTQSPSSLSASVGDRVSFTCQASQDINNFLNWFYQKPGKAPKLLI
YDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQYGNLPFT
FGGGTKVEIKRGGGGSGGGSGGGGSQVQLQESGPELVKPSSETLSLT
CTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKLEWIGYIYYSGSTNYPNPSLKSRTI
SVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCVSLVYCGGDCYSGFDYWGQ
GTLVTVSSAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLEFPGPSKPFVVLVV
VGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKH
YQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE
YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM
KGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR (SEQ ID NO.
40)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD28 CD3 дзета для клона 24C1

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCC
TGCACGCCGCACGCCGGATATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCT
CTTTGAGTGCCTCCGTGGGTGACCGCTCTTTCACTTGCCAAGC
CAGCCAAGACATCAACAATTTCTGAATTGGTACCAGCAGAAACC
AGGCAAAAGCACCAAAGCTCCTCATCTACGACGCCTCCAACCTGGA
AACCAGGGGTGCCAGCAGGTTTAGCGGGAGCGGTTCTGGCACGG
ATTTTACGTTACCATCTCCTCTCTGCAGCCGAGGATATAGCTAC
TTATTACTGTCAGCAGTACGGGAATCTGCCATTTACTTTTGGGGGT
GGAACATAAGGTGAAATCAAAAGGGGCGGCGGGGAAGCGGGG
GCGGGGGCTCAGGTGGCGGAGGGAGCCAGGTGCAACTCCAGGAA
AGTGGCCAGGATTGGTGAAGCCCAGCGAGACCCTTTCCCTTACT
TGTAAGTGTAGCGGAGGCAGCATAAGCAGCTACTATTGGTCTCGG
ATCAGACAGCCACCAGGAAAGGGCTTGAATGGATTGGCTACATT
TACTATTCGGGTCCACCAACTACAACCCATCCCTCAAGTCCCGC
GTGACAATTTCCGTCGACACAAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAA
CTTAGTAGCGTCACTGCTGCAGATACAGCAGTGTACTATTGTGTC
AGCCTTGTCTACTGTGGCGGCGACTGCTACAGTGGCTTTGATTACT
GGGGACAGGGCACGCTCGTGACAGTGTCCAGCGCTGCGGCTATCG
AGGTAATGTATCCGCCACCGTATCTGGACAACGAGAAGTCTAATG
GGACAATCATTACGTGAAGGGGAAGCACCTGTGTCCATCCCCC

TGTTTCCGGGTCCCAGTAAACCCCTTCTGGGTGCTTGTGTCGTTGG
 CGGGGTGCTGGCCTGCTATTCCCTGCTGGTGACCGTCGCGTTTATT
 ATTTTCTGGGTTAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGAT
 TACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACAC
 TACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTGCTGCCTATCGGAGC
 AGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAG
 GGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTAACCTGGGACGCAGGGA
 AGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGA
 TGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCCCAAGGAGGGTCTCTAT
 AATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAAT
 AGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGT
 TTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCT
 CTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGGTAA (SEQ ID NO. 41)

AK тяжелой и легкой цепей CAR CD28 CD3 дзета для клона 24C1

(Сигнальный пептид выделен жирным шрифтом)

MALPVTALLPLALLHAARPDIQLTQSPSSLSASVGDRVSFTCQAS
 QDINNFLNWYQKPKGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTF
 TISSLPEDIATYYCQYGNLPFTFGGGTKVEIKRGGGSGGGGSGG
 GGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGL
 EWIGYIYSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVY
 YCVSLVYCGDCYSGFDYWQGTLVTVSSAAAEVMPYPYLDNEK
 SNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWLVVVGGVLACYSLLVTVAFI
 IFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSR
 VKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMG
 GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQ
 GLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO. 42)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD28 CD3 дзета для клона 24C1

GATATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTCTTTGAGTGCCTCCGTGG
 GTGACCGCTCTCTTTCACTTGCCAAGCCAGCCAAGACATCAACA
 ACTTTCTGAATTGGTACCAGCAGAAACCAGGCAAAGCACCAAAG
 CTCCTCATCTACGACGCCTCCAACCTGGAAACCGGGGTGCCAGC
 AGGTTTAGCGGGAGCGGTTCTGGCACGGATTTTACGTTACCATC

TCCTCTCTGCAGCCCGAGGATATAGCTACTTATTACTGTCAGCAGT
ACGGGAATCTGCCATTTACTTTTGGGGGTGGAAC TAAGGTGGAAA
TCAAAAGGGGCGGCGGGGAAGCGGGGCGGGGCTCAGGTGGC
GGAGGGAGCCAGGTGCAACTCCAGGAAAGTGGCCAGGATTGGT
GAAGCCCAGCGAGACCCTTCCCTTACTTGTACTGTTAGCGGAGG
CAGCATAAGCAGCTACTATTGGTCCCTGGATCAGACAGCCACCAGG
GAAAGGGCTTGAATGGATTGGCTACATTTACTATTCCGGGTCCAC
CAACTACAACCCATCCCTCAAGTCCCGCGTGACAATTTCCGTCGA
CACAAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAACTTAGTAGCGTCACTGC
TGCAGATACAGCAGTGTACTATTGTGTCAGCCTTGTCTACTGTGGC
GGCGACTGCTACAGTGGCTTTGATTACTGGGGACAGGGCACGCTC
GTGACAGTGTCCAGCGCTGCGGCTATCGAGGTAATGTATCCGCCA
CCGTATCTGGACAACGAGAAGTCTAATGGGACAATCATTACCGTG
AAGGGGAAGCACCTGTGTCCATCCCCCTGTTTCCGGGTCCCAGT
AAACCCTTCTGGGTGCTTGTGTCGTTGGCGGGGTGCTGGCCTGCT
ATTCCTGCTGGTGACCGTTCGCTTTATTATTTTCTGGGTTAGATC
CAAAAGAAGCCGCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCC
ACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACTACCAGCCTTACGCACC
ACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAG
ATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTA
TAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGG
ACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGA
CGAAAAAACCCCAAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGA
TAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGC
GGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGC
ACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTG
CCACCTAGG (SEQ ID NO. 43)

AK тяжелой и легкой цепей CAR CD28 CD3 дзета для клона 24C1

DIQLTQSPSSLSASVGDRVSFTCQASQDINNFLNWXQKPGKAPKLLI
YDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQYGNLPFT
FGGGTKVEIKRGGGSGGGSGGGSSQVQLQESGGLVKPSETLSLT
CTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKLEWIGYIYYSGSTNYPNPSLKS RVTI
SVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCVSLVYCGGDCYSGFDYWGQ

GTLVTVSSAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPPLFPGPS
 KPFWVLVVVGGVLCYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMT
 RRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYN
 ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM
 AEAYSEIGMKGERRRKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
 (SEQ ID NO. 44)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD8 CD3 дзета для клона 24C1

ATGGCACTCCCCGTAACCTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCC
 TGCACGCCGCACGCCCGGACATTCAATTGACCCAGTCCCCTAGCA
 GTCTCTCAGCAAGTGTGGGAGATAGGGGTGTCATTCACCTGTCAGG
 CTTCACAGGACATCAACAACCTCCTCAATTGGTATCAGCAGAAGC
 CAGGGAAGGCACCAAGCTGCTCATATATGACGCTTCAAACCTTG
 AAACCGGAGTACCTAGCCGCTTCAGCGGAAGCGGATCAGGGACT
 GACTTCACTTTTACCATCTCTTCACTGCAGCCCCGAAGACATCGCCA
 CATACTACTGCCAGCAGTACGGAACTTGCCTTTTACATTTGGGG
 GCGGCACCAAGTGGAGATTAAGCGAGGGGGAGGCGGCTCAGGA
 GGCGGTGGCTCCGGAGGCGGGGGTCCAGGTCCAGCTCCAGGA
 ATCCGGCCCAGGTCTGGTTAAGCCCAGTGAACTTTGTCCCTCAC
 GTGTACTGTGAGCGGTGGTTCAATCTCCTCATACTATTGGTCTTGG
 ATACGGCAACCTCCTGGAAAGGGCCTCGAGTGATCGGCTATATC
 TACTATAGTGGCTCCACTAATTACAACCCTTCCCTCAAGTCCAGA
 GTCACCATTTCCGTGGACACATCTAAGAACCAGTTCAGTCTGAAG
 TTGTCCAGCGTTACAGCCGCAGACACAGCCGTTTATTACTGTGTGT
 CTCTTGTTTACTGCGGGGAGACTGTTATAGCGGCTTCGATTACTG
 GGGCCAGGGCACCTTGGTCACAGTCTCTTCCGCGGCCGCCCTCTC
 TAACAGTATTATGTACTTTTCTCATTTTGTACCCGTGTTCTCCCG
 CTAAGCCAACTACTACCCCGCCACGGCCGCTACCCCTGCAC
 CCACAATAGCCAGTCAGCCTTTGAGCCTGAGACCTGAGGCTTGTG
 GGCCGGCTGCTGGGGGTGCAGTGCACACACGAGGTCTTGATTTTG
 CTTGCGACATATACATCTGGGCCCTCTGGCCGGGACCTGTGGGG
 TGCTGCTTCTGAGCTTGGTCATCACGCTCTATTGCAACCATCGCAA
 CAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATAT
 GACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACTACCAGCCCTTA

CGCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTT
 TTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCA
 ACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACG
 TTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAA
 CCAAGACGAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCA
 GAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAG
 GAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGA
 CTCAGACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAA
 GCCCTGCCACCTAGGTAA (SEQ ID NO. 45)

АК тяжелой и легкой цепей CAR CD8 CD3 дзета для клона 24C1

(Сигнальный пептид выделен **жирным шрифтом**)

MALPVTALLPLALLHAARPDIQLTQSPSSLSASVGDVRSFTCQAS
 QDINNFLNWXQKPKGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTF
 TISSLPEDIATYYCQYGNLPFTFGGGTKVEIKRGGGSGGGSGG
 GGSQVQLQESGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGL
 EWIGYIYSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVY
 YCVSLVYCGGDCYSGFDYWGQGLTVTVSSAAALSNSIMYFSHFVPV
 FLPKPTTTPAPRPPTPARTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA
 CDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLLHSDYMNMTPT
 RRPGRTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYN
 ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM
 AEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
 (SEQ ID NO. 46)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD8 CD3 дзета для клона 24C1

GACATTCAATTGACCCAGTCCCCTAGCAGTCTCTCAGCAAGTGTG
 GGAGATAGGGTGTCAATCACCTGTCAGGCTTACAGGACATCAAC
 AACTTCCTCAATTGGTATCAGCAGAAGCCAGGGAAGGCACCAAA
 GCTGCTCATATATGACGCTTCAAACCTTAAAACCGGAGTACCTAG
 CCGCTTACAGCGAAGCGGATCAGGGACTGACTTCACTTTTACCAT
 CTCTTCACTGCAGCCCGAAGACATCGCCACATACTACTGCCAGCA
 GTACGGAAACTTGCTTTTACATTTGGGGGCGGCACCAAAGTGGA
 GATTAAGCGAGGGGGAGGCGGCTCAGGAGGCGGTGGCTCCGGAG

GCGGGGGTCCCAGGTCCAGCTCCAGGAATCCGGCCCAGGTCTGG
 TTAAGCCAGTGAAACTTTGTCCCTCACGTGTAAGTGTGAGCGGTG
 GTTCAATCTCCTCATACTATTGGTCTTGATACGGCAACCTCCTGG
 AAAGGGCCTCGAGTGGATCGGCTATATCTACTATAGTGGCTCCAC
 TAATTACAACCCTTCCCTCAAGTCCAGAGTCACCATTTCCGTGGAC
 ACATCTAAGAACCAGTTCAGTCTGAAGTTGTCCAGCGTTACAGCC
 GCAGACACAGCCGTTTATTACTGTGTGTCTCTTGTTTACTGCGGGG
 GAGACTGTTATAGCGGCTTCGATTACTGGGGCCAGGGCACCTGG
 TCACAGTCTCTTCCGCGGCCGCCCTCTCTAACAGTATTATGTA
 TTCTCATTTTGTACCCGTGTTCCCTTCCCCTAAGCCAACTACTACC
 CCGGCCCCACGGCCGCTACCCCTGCACCCACAATAGCCAGTCAG
 CCTTTGAGCCTGAGACCTGAGGCTTGTGCGCCGGCTGCTGGGGGT
 GCAGTGCACACACGAGGTCTTGATTTTGTCTGCGACATATACATC
 TGGGCCCCCTCTGGCCGGGACCTGTGGGGTGCTGCTTCTGAGCTTG
 GTCATCACGCTCTATTGCAACCATCGCAACAGATCCAAAAGAAGC
 CGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCT
 GGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGAT
 TTCGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGAT
 GCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCT
 CAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCA
 GAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAAC
 CCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCT
 GAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGG
 AAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGA
 AGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGG
 (SEQ ID NO. 47)

AK тяжелой и легкой цепей CAR CD8 CD3 дзета для клона 24C1

DIQLTQSPSSLSASVGDVRSFTCQASQDINNFLNWXQKPKAPKLLI
 YDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFFTISSLQPEDIATYYCQYGNLPFT
 FGGGTKVEIKRGGGGSGGGGSGGGGSSVQLQESGGLVKPSETLSLT
 CTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRTVI
 SVDTSKNQFSLKLSVTADTAVYYCVSLVYCGGDCYSGFDYWGQGT
 LVTVSSAAALSNSIMYFSHFVPLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS

LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLY
CNHRNRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
RVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGREEYDVLDKRRGRDPEMG
GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ
GLSTATK DTYDALHMQA LPPR (SEQ ID NO. 48)

ДНК тяжелой цепи (HC) для клона 24C8

CAGGTACAGCTGCAGGAATCTGGGCCCCGACTTGTCAGCCAAGT
CAGACACTTTCTCTTACATGTACCGTGAGCGCGGAAGTATAAGC
AGTGGAGGCTTTTACTGGTCTTGATACGGCAGCACCCAGGCAAA
GGCTTGGAGTGGATTGGATACATTCATCATTAGGATCTACACAC
TATAATCCATCCCTTAAGTCCCAGGTCACCATTAGCATTGATACGT
СТААГААТСТГТТСАГТСТСАГГСТГСТСТСТСТСТСТСТСТСТСТ
CACAGCCGTGTACTACTGCGCCTCTTGGTTTACTGCGGAGGCGA
CTGTTATAGCGGCTTTGATTATTGGGGCAGGGGACCCTCGTAAC
CGTGAGCTCT (SEQ ID NO. 48)

АК HC для клона 24C8 (CDR отмечены подчеркиванием)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGFYWSWIRQHPGKGL
EWIGYIHHSGSTHYNPSLKSRTVISIDTSKLNFLSRLSSVTAADTAVYY
CASLVYCGGDCYSGFDYWQGTLVTVSS (SEQ ID NO. 50)

АК CDR1 HC для клона 24C8: GGSISSGGF (SEQ ID NO. 51)

АК CDR2 HC для клона 24C8: HHSGS (SEQ ID NO. 52)

АК CDR3 HC для клона 24C8: LVYCGGDCYS GFDY (SEQ ID NO.

ДНК легкой цепи (LC) для клона 24C8

GATATCCAGCTCACTCAAAGCCCCTTAGTCTCTCTGCCTCAGTGG
GGGATCGGGTCAGTTTTACTTGTCAAGCTTACAGGATATCAACA
АСТТСТТААТТГГТАТСАГСАГААГССАГГААААГСАССАААААААА
TGCTCATCTATGATGCCTCAAATTTGGAGACGGGTGTTCCCAGTC
GATTCTCTGGGTCAGGGTCCGGGACCGACTTTACGTTTACGATCTC
CTCTCTGCAGCCCCAAGACATCGCCACATACTATTGTCAACAGTA

CGGCAACTTGCCTTTCACATTTGGGGGCGGGACTAAGGTTGAAAT
CAAGAGG (SEQ ID NO. 54)

AK LC для клона 24C8 (CDR отмечены подчеркиванием)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVSFTCQASQDINNFLNWYQKPGKAPKLLI
YDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQYGNLPFT
FGGGTKVEIKR (SEQ ID NO. 55)

AK CDR1 LC для клона 24C8: QASQDINNFLN (SEQ ID NO. 56)

AK CDR2 LC для клона 24C8: DASNLET (SEQ ID NO. 57)

AK CDR3 LC для клона 24C8: QQYGNLPFT (SEQ ID NO. 58)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD28T CD3 дзета для клона 24C8

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCC
TGCACGCCGCACGCCCGCAGGTACAGCTGCAGGAATCTGGGCCCCG
GACTTGTCAAGCCAAGTCAGACACTTTCTTACATGTACCGTGA
GCGGCGGAAGTATAAGCAGTGGAGGCTTTTACTGGTCTTGGATAC
GGCAGCACCCAGGCAAAGGCTTGGAGTGGATTGGATACATTCATC
ATTCAGGATCTACACACTATAATCCATCCCTTAAGTCCCGGGTCA
CCATTAGCATTGATACGTCTAAGAATCTGTTCACTCAGGCTGTC
CTCCGTCAGTCTGCCGACACAGCCGTGTAAGTCTGCGCCTCCTTG
GTTTACTGCGGAGGCGACTGTTATAGCGGCTTTGATTATTGGGGG
CAGGGGACCCTCGTAACCGTGAGCTCTGGAGGGGGTGGGAGCGG
GGGAGGAGGTTCAAGGGGGGGCGGCTCCGATATCCAGCTCACTC
AAAGCCCCTCTAGTCTCTGCTCAGTGGGGGATCGGGTCAGTT
TTACTTGTCAAGCTTCAAGGATATCAACAACCTTCTTAATTGGTA
TCAGCAGAAGCCAGGAAAAGCACCCAAGCTGCTCATCTATGATGC
CTCAAATTTGGAGACGGGTGTTCCAGTCGATTCTCTGGGTCAGG
GTCCGGGACCGACTTTACGTTTACGATCTCCTCTCTGCAGCCCGAA
GACATCGCCACATACTATTGTCAACAGTACGGCAACTTGCCTTTC
ACATTTGGGGGCGGGACTAAGGTTGAAATCAAGAGGGCCGCTGC
ACTGGACAATGAGAAGTCCAACGGCACCATCATCCACGTGAAGG
GCAAGCACCTGTGCCCTAGTCTCTGTTCCAGGCCCATCCAAC

CTTTTGGGTTCTTGTGTGGTCGGGGGGGTGCTGGCCTGCTATTC
TCTGCTGGTCACGGTGGCCTTCATAATTTTCTGGGTTAGATCCAAA
AGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGC
CGCCCTGGCCCCACAAGGAAACTACCAGCCTTACGCACCACCT
AGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCT
GCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAA
CGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACA
AGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGA
AAAAACCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAA
GATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGA
GAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACT
GCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCA
CCTAGGTAA (SEQ ID NO. 59)

AK тяжелой и легкой цепей CAR CD28T CD3 дзета для клона 24C8

(Сигнальный пептид выделен жирным шрифтом)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLQESGPELVKPSQTLSTCTV
SGSISGGFYWSWIRQHPGKLEWIGYIHHSSTHYNPSLKSRTIS
DTSKNLFSRLSSVTAADTAVYYCASLVYCGGDCYSGFDYWGQGL
VTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQLTQSPSSLSASVGRVSTFCQASQ
DINNFLNWFYQKPKGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGTDFFTI
SSLQPEDATYYCQYGNLPFTFGGGTKVEIKRAAALDNEKSNGTIHH
VKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLLVVGVLACYLLVTVAFIFWVRS
KRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRS
ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTAT
KDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO. 60)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD28T CD3 дзета для клона 24C8

CAGGTACAGCTGCAGGAATCTGGGCCCCGACTTGTCAGCCAAGT
CAGACACTTTCTTACATGTACCGTGAGCGCGGAAGTATAAGC
AGTGGAGGCTTTTACTGGTCTTGATAACGGCAGCACCCAGGCAAA
GGCTTGAGTGGATTGGATACATTCATCATTAGGATCTACACAC
TATAATCCATCCCTTAAGTCCCGGGTACCATTAGCATTGATACGT

CTAAGAATCTGTTCACTCTCAGGCTGTCTCCGTCCTGCTGCCGA
CACAGCCGTGTACTACTGCGCTCCTTGGTTTACTGCGGAGGCGA
CTGTTATAGCGGCTTTGATTATTGGGGGCAGGGGACCCTCGTAAC
CGTGAGCTCTGGAGGGGGTGGGAGCGGGGAGGAGGTTACAGGGG
GGGGCGGCTCCGATATCCAGCTCACTCAAAGCCCCTCTAGTCTCT
CTGCCCTCAGTGGGGGATCGGGTCAGTTTTACTTGTCAAGCTTAC
AGGATATCAACAACCTTCTTAATTGGTATCAGCAGAAGCCAGGAA
AAGCACCCAAGCTGCTCATCTATGATGCCTCAAATTTGGAGACGG
GTGTTCCAGTCGATTCTCTGGGTACAGGTCCGGGACCGACTTAA
CGTTTACGATCTCCTCTCTGCAGCCCGAAGACATCGCCACATACT
ATTGTCAACAGTACGGCAACTTGCCTTTACATTTGGGGGCGGGA
CTAAGGTTGAAATCAAGAGGGCCGCTGCACTGGACAATGAGAAG
TCCAACGGCACCATCATCCACGTGAAGGGCAAGCACCTGTGCCCT
AGTCCTCTGTTCCAGGCCATCCAAACCTTTTTGGGTTCTTGTG
TGGTCGGGGGGTGTGGCCTGCTATTCTCTGCTGGTACGGTGG
CCTTCATAATTTCTGGGTTAGATCCAAAAGAAGCCGCTGCTCC
ATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAA
GGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCC
ATCGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGT
ATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGA
CGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGA
CCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCCCAGGAGG
GTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATT
CTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCA
CGACGGTTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTA
TGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGG (SEQ ID NO. 61)

AK тяжелой и легкой цепей CAR CD28T CD3 дзета для клона 24C8

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGFYWSWIRQHPGKGL
EWIGYIHHSSTHYNPSLKSRTVISIDTSKNLFSRLSSVTAADTAVYY
CASLVYCGGDCYSGFYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDI
QLTQSPSSLSASVGDVRSFTQCASQDINNFLNWFYQKPKGKAPKLLIY
DASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQYGNLPFTF
GGGKVEIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVVL

VVVGGVLACYLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTR
 KHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRR
 EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEI
 GMKGERRRGKGHDLGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR (SEQ ID
 NO. 62)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD28 CD3 дзета для клона 24C8

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCC
 TGCACGCCGCACGCCCGCAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGTCCG
 GGACTTGTCAAGCCGTCCCAAACGCTGAGTCTGACGTGTACTGTC
 TCTGGTGGCTCTATTTCTCCGGGGGCTTTTATTGGTCTTGGATCA
 GACAACACCCTGGCAAAGGGCTGGAGTGGATAGGGTATATTCAC
 CACTCTGGGTCCACTCACTACAACCCATCATTGAAATCCAGAGTG
 ACTATCTCAATCGACACATCCAAGAACCTTTTCAGCCTGAGGTTG
 TCATCAGTTACCGCCGCTGACACCGCGGTGATTATTGCGCCTCTC
 TCGTGTACTGCGGTGGCGATTGTTATAGTGGCTTTGACTACTGGG
 GGCAGGGGACATTGGTTACCGTTTCAAGTGGAGGCGGTGGGTCTG
 GCGGGGGCGGTAGCGGAGGTGGGGGGAGCGACATACAGCTTACG
 CAGAGCCCTCCAGCCTTTTCAGCCTCCGTGGGGGATAGGGTGTCC
 TTTACCTGCCAGGCTTCCCAGGACATAAAACAACCTTCTCAATTGGT
 ATCAGCAAAAAGCCCGGGAAAGCACCAAAGCTGCTCATCTACGAT
 GCCAGCAACCTGGAAACCGGAGTGCCGTCTCGCTTCTCTGGAAGT
 GGCAGTGGGACCGATTTCACCTTTTACAATCTCAAGTTTGCAGCCA
 GAAGACATTGCAACATACTACTGTCAACAGTACGGCAATCTCCCC
 TTTACATTTGGGGGGGAACTAAAGTGGAGATTAAGCGCGCTGCA
 GCCATTGAAGTTATGTATCCGCCCCCGTATCTGGATAACGAGAAA
 TCTAATGGTACCATAATACATGTGAAGGGGAAGCACCTCTGTCCA
 TCACCGCTGTTCCCGGCCCTTCAAACCTTTCTGGGTACTCGTTG
 TCGTGGGTGGAGTTCTGGCCTGCTATAGTCTGCTGGTGACCGTGG
 CGTTTATCATCTTCTGGGTAAGATCCAAAAGAAGCCGCTGCTCC
 ATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAA
 GGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCT
 ATCGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGT
 ATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGA
 CGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGA
 CCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCCCAAGGAGG
 GTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATT
 CTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCA
 CGACGGTTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTA
 TGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGGTAA (SEQ ID NO.
 63)

АК тяжелой и легкой цепей CAR CD28 CD3 дзета для клона 24C8

(Сигнальный пептид выделен **жирным шрифтом**)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS
 GGSISSGGFYWSWIRQHPGKGLEWIGYIHHSGSTHYNPSLKSRVTISI
 DTSKNLFSRLSSVTAADTAVYYCASLVYCGGDCYSGFDYWGGQTL
 VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRVSFTQCASQ
 DINNFLNWFYQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFFTI
 SSLQPEDIATYYCQYGNLPFTFGGGTKVEIKRAAAIEVMYPPPYLD
 NEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFVWLVVVGGVLACYSSLVT
 VAFIIFWVRSKRSLRHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAY
 RSRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPE
 MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDL
 YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO. 64)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD28 CD3 дзета для клона 24C8

CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGTCCGGGACTTGTCAAGCCGTCC
 CAAACGCTGAGTCTGACGTGTAAGTCTCTGGTGGCTCTATTTCTT
 CCGGGGGCTTTTATTGGTCTTGGATCAGACAACACCCTGGCAAAG
 GGCTGGAGTGGATAGGGTATATTCACCACTCTGGGTCCACTCACT
 ACAACCCATCATTGAAATCCAGAGTGAATCTCAATCGACACAT
 CCAAGAACCTTTTCAGCCTGAGGTTGTCATCAGTTACCGCCGCTG
 ACACCGCGGTGATATTGCGCCTCTCTCGTGTACTGCGGTGGCG
 ATTGTTATAGTGGCTTTGACTACTGGGGGCAGGGGACATTGGTTA
 CCGTTTCAAGTGGAGGCGGTGGGTCTGGCGGGGGCGGTAGCGGA
 GGTGGGGGGAGCGACATACAGCTTACGCAGAGCCCCTCCAGCCTT
 TCAGCCTCCGTGGGGGATAGGGTGTCCCTTACCTGCCAGGCTTCC
 CAGGACATAAAACAATTCCTCAATTGGTATCAGCAAAAGCCC
 AAAGCACCAAAGCTGCTCATCTACGATGCCAGCAACCTGGAAACC
 GGAGTGCCGTCTCGCTTCTCTGGAAGTGGCAGTGGGACCGATTTC
 ACTTTTACAATCTCAAGTTTGCAGCCAGAAGACATTGCAACATA
 TACTGTCAACAGTACGGCAATCTCCCTTTACATTTGGGGGGGA
 ACTAAAGTGGAGATTAAGCGCGCTGCAGCCATTGAAGTTATGTAT
 CCGCCCCGTATCTGGATAACGAGAAATCTAATGGTACCATAATA
 CATGTGAAGGGGAAGCACCTCTGTCCATCACCGCTGTTCCCCGGC

CCTTCAAAACCTTTCTGGGTACTCGTTGTCGTGGGTGGAGTTCTGG
 CCTGCTATAGTCTGCTGGTGACCGTGGCGTTTATCATCTTCTGGGT
 AAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATAT
 GACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTA
 CGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTT
 TTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCA
 ACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACG
 TTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAA
 CCAAGACGAAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCA
 GAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAG
 GAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGCACGACGGTTTGTACCAGGGA
 CTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAA
 GCCCTGCCACCTAGG (SEQ ID NO. 65)

АК тяжелой и легкой цепей CAR CD28 CD3 дзета для клона 24C8

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGISGGFYWSWIRQHPGKGL
 EWIGYIHHSGSTHYNPSLKSRTVISIDTSKNLFSRLSSVTAADTAVYY
 CASLVYCGGDCYSGFYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDI
 QLTQSPSSLSASVGDVRSFTCSQASQDINFLNFWYQQKPGKAPKLLIY
 DASNLETGVPSPRFSGSGSGTDFFTISSLQPEDATYYCQQYGNLPFTF
 GGGTKVEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFP
 PSKPFWVLLVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMN
 TPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNL
 YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD
 KMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDLVYQGLSTATKDTYDALHMQALP
 PR (SEQ ID NO. 66)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD8 CD3 дзета для клона 24C8

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCC
 TGCACGCCGCACGCCGCAGGTGCAGTTGCAGGAAAGCGGGCCT
 GGCCTTGTAACCAAGCCAGACACTGAGCCTGACATGCACTGTG
 TCCGGCGGGTCCATATCTTCCGGGGTTTTTATTGGTCCTGGATAC
 GCCAGCATCCCGGAAAGGACTTGAATGGATTGGATATATCCACC
 ATTCCGGAAGCACCCACTACAATCCAAGCCTTAAATCCCGGGTGA

CAATCTCCATCGACACCTCAAAGAATCTTTTTTCCCTGCGGTTGTC
TTCAGTAACTGCCCGGATAACCGCTGTGTACTACTGTGCCAGCCTC
GTCTATTGCGGCGGAGATTGTTATTCTGGGTTTCGATTATTGGGGTC
AAGGCACACTGGTAACTGTCAGCAGCGGAGGCGGCGGTTCCGGG
GGCGGGGGCAGTGGAGGGGGCGGATCTGACATTCAGCTTACGCA
GTCCCCATCTTCACTTAGCGCCAGCGTTGGCGATCGGGTCAGCTTC
ACGTGTCAAGCAAGTCAGGATATCAACAACCTTCTTAACTGGTAC
CAGCAGAAGCCAGGCAAGGCACCCAAGTTGCTGATTTACGATGCT
TCTAACCTCGAGACGGGAGTGCCTAGCCGCTTCTCCGGGAGCGGC
AGCGGCACAGACTTTACCTTTACGATTTCCAGTCTGCAGCCAGAG
GATATAGCAACTTATTACTGTCAGCAGTATGGCAACCTCCCTTTTA
CCTTCGGTGGTGGCACAAAGGTCGAGATAAAAGAGCCGCAGCG
TTGTCCAACCTCCATAATGTATTTTTCTCATTTTGTGCCGCTTTCT
GCCTGCCAAACCTACCACCACCCCGCCCCACGACCACCTACTCC
AGCCCCACCATCGCCTCCCAGCCCCCTCAGCCTGAGGCCAGAGGC
TTGTGCCCCTGCTGCGGGGGGCGCTGTCCATAACCAGAGGACTCGA
CTTCGCCTGCGATATTTATATATGGGCCCCCCCTCGCCGGCACCTGC
GGAGTCTTGCTCCTGAGCCTTGTGATCACGCTTTATTGTAACCATC
GGAATAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGA
ATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGC
CTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGA
AGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGA
ACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTAT
GACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGG
CAAACCAAGACGAAAAAACCCCAAGGAGGGTCTCTATAATGAGC
TGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATG
AAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCA
GGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACAT
GCAAGCCCTGCCACCTAGGTAA (SEQ ID NO. 67)

AK тяжелой и легкой цепей CAR CD8 CD3 дзета для клона 24C8

(Сигнальный пептид выделен **жирным шрифтом**)

MALPVTALLLPLALLHAARPQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS
GGSISSGGFYWSWIRQHPGKLEWIGYIHHSGSTHYNPSLKSRTISI

DTSKNLFLSLRLSSVTAADTAVYYCASLVYCGGDCYSGFDYWGQGL
VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDVRSFTCQASQ
DINNFLNWXQKPKGKAPKLLIYDASNLETGVPRFSGSGSGTDFTFIS
SLQPEDIATYYCQYGNLPFTFGGGTKVEIKRAAALSNSIMYFSHFVPV
FLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA
CDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLLHSDYMNMT
RRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYN
ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM
AEAYSEIGMKGERRRGKGHGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
(SEQ ID NO. 68)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD8 CD3 дзета для клона 24C8

CAGGTGCAGTTGCAGGAAAGCGGGCCTGGCCTTGTGAAACCAAG
CCAGACACTGAGCCTGACATGCACTGTGTCCGGCGGGTCCATATC
TTCCGGGGGTTTTTATTGGTCCTGGATACGCCAGCATCCCGGGAA
AGGACTTGAATGGATTGGATATATCCACCATTCCGGAAGCACCCA
CTACAATCCAAGCCTTAAATCCCGGGTGACAATCTCCATCGACAC
CTCAAAGAATCTTTTTCCCTGCGGTTGTCTCAGTAACTGCCGCC
GATACCGCTGTGTACTACTGTGCCAGCCTCGTCTATTGCGGCGGA
GATTGTTATTCTGGGTTGATTATTGGGGTCAAGGCACACTGGTA
ACTGTCAGCAGCGGAGGCGGCGGTTCCGGGGGCGGGGCGAGTGG
AGGGGGCGGATCTGACATTCAGCTTACGCAGTCCCCATCTTCACT
TAGCGCCAGCGTTGGCGATCGGGTCAGCTTACGTGTCAAGCAAG
TCAGGATATCAACAACCTTTCTTAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGG
CAAGGCACCCAAGTTGCTGATTTACGATGCTTCTAACCTCGAGAC
GGGAGTGCCTAGCCGCTTCTCCGGGAGCGGCAGCGGCACAGACTT
TACCTTTACGATTTCCAGTCTGCAGCCAGAGGATATAGCAACTTA
TACTGTGTCAGCAGTATGGCAACCTCCCTTTTACCTTCGGTGGTGGC
ACAAAGGTCGAGATTAAGAGCCGCAGCGTTGTCCAACCTCCATA
ATGTATTTTTCTCATTTTGTGCCCGTCTTCTGCCTGCCAAACCTAC
CACCACCCCGCCCCACGACCACCTACTCCAGCCCCCACCATCGC
CTCCCAGCCCCCTCAGCCTGAGGCCAGAGGCTTGTGCCCCTGCTGC
GGGGGGCGCTGTCCATACCAGAGGACTCGACTTCGCCTGCGATAT
TTATATATGGGCCCCCTCGCCGGCACCTGCGGAGTCTTGCTCCTG

AGCCTTGTGATCACGCTTTATTGTAACCATCGGAATAGATCCAAA
 AGAAGCCGCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGC
 CGCCCTGGCCCCACAAGGAAACTACCAGCCTTACGCACCACCT
 AGAGATTTTCGCTGCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCT
 GCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAA
 CGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACA
 AGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGA
 AAAAAACCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAA
 GATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGA
 GAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACT
 GCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCA
 CCTAGG (SEQ ID NO. 69)

AK тяжелой и легкой цепей CAR CD8 CD3 дзета для клона 24C8

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGISGFFYWSWIRQHPGKGL
 EWIGYIHHSSTHYNPSLKSRTVISIDTSKNLFLRLSSVTAADTAVYY
 CASLVYCGGDCYSGFYWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDI
 QLTQSPSSLSASVGDVRSFTCSQASQDINFLNWFYQKPGKAPKLLIY
 DASNLETGVPFRFSGSGSDFTFTISLQPEDATYYCQYGNLPFTF
 GGGTKVEIKRAAALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIA
 SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLSL
 VITLYCNHRNRKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDF
 AAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG
 RDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
 HDGLYQGLSTA TKD TYDALHM QALPPR (SEQ ID NO. 70)

ДНК HC для клона 20C5.1

CAGGTCCAACCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTCAAGAAACCAGG
 TGCCTCCGTTAAAGTGAGTTGCAAAGTCTCTGGATACTCTGAC
 CGAGCTCTCTATGCACTGGGTCCGGCAGGCCCCGGCAAGGGATT
 GGAATGGATGGGCGGGTTCGATCCTGAGGACGGAGAGACTATCT
 ACGCTCAAAAATTCCAGGGACGAGTGACTGTGACCGAAGACACT
 AGTACCGACACTGCCTACATGGAACCTTCTCTCTGCGATCAGAA
 GATACCGCAGTGTACTACTGTGCTACTGAATCTAGGGGCATTGGA

TGGCCCTACTTCGATTACTGGGGTCAGGGAACCTCTGGTGACTGTC
TCCAGC (SEQ ID NO. 71)

АК НС для клона 20С5.1 (CDR отмечены подчеркиванием)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGL
EWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTVTEDTSTDТАYMESSLRSEDT
AVYYCATESRGIGWPYFDYWGGTLVTVSS (SEQ ID NO. 72)

АК CDR1 НС для клона 20С5.1: GYTLTEL (SEQ ID NO. 73)

АК CDR2 НС для клона 20С5.1: DPEDGE (SEQ ID NO. 74)

АК CDR3 НС для клона 20С5.1: ESRGIGWPYFDY (SEQ ID NO. 75)

ДНК LC для клона 20С5.1

GATATTCAGATGACTCAATCTCCTTCTTCTGTCCGCTTCCGTGG
GCGATAGAGTGACCATTACTTGTAGGGCGTCCCAGTCAATCTCCA
GTTATTTGAATTGGTATCAGCAGAAGCCCGGAAAGCACCTAAGC
TGTTGATCAGCGGGGCTTCTAGCCTGAAGAGTGGGGTACCTTCAC
GGTTCAGCGGAAGCGGAAGCGGAACCGATTCACCCTGACTATCA
GCAGCCTGCCACCTGAGGACTTTGCAACTTACTACTGCCAACAGT
CATAACAGCACTCCGATCACTTTCGGCCAGGGCACCCGGCTCGAAA
TCAAGCGC (SEQ ID NO. 76)

АК LC для клона 20С5.1 (CDR отмечены подчеркиванием)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
SGASSLKSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPPEDFATYYCQSYSTPITF
GQGRLEIKR (SEQ ID NO. 77)

АК CDR1 LC для клона 20С5.1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO. 78)

АК CDR2 LC для клона 20С5.1: GASSLKS (SEQ ID NO. 79)

АК CDR3 LC для клона 20С5.1: QQSYSTPIT (SEQ ID NO. 80)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD28Т CD3 дзета для клона 20С5.1

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCC
TGCACGCCGCACGCCCGCAGGTCCAAGTGGTGCAGTCCGGAGCCC
AAGTCAAGAAACCAGGTGCCTCCGTAAAGTGAGTTGCAAAGTCT
CTGGATACACTCTGACCGAGCTCTCTATGCACTGGGTCCGGCAGG
CCCCCGGCAAGGGATTGGAATGGATGGGCGGGTTCGATCCTGAG
GACGGAGAGACTATCTACGCTCAAAAATTCCAGGGACGAGTGAC
TGTGACCGAAGACACTAGTACCGACACTGCCTACATGGAACCTTC
CTCTCTGCGATCAGAAGATAACCGCAGTGTACTACTGTGCTACTGA
ATCTAGGGGCATTGGATGGCCCTACTTCGATTACTGGGGTCAGGG
AACTCTGGTGACTGTCTCCAGCGGTGGAGGTGGCAGCGGTGGTGG
CGGAAGCGGGGGGGCGGCTCTGATATTCAGATGACTCAATCTCC
TTCTTCTGTCCGCTTCCGTGGGCGATAGAGTGACCATTACTTGT
AGGGCGTCCCAGTCAATCTCCAGTTATTTGAATTGGTATCAGCAG
AAGCCCGGAAAGCACCTAAGCTGTTGATCAGCGGGGCTTCTAGC
CTGAAGAGTGGGGTACCTTCACGGTTCAGCGGAAGCGGAAGCGG
AACCGATTTACCCCTGACTATCAGCAGCTGCCACCTGAGGACTT
TGCAACTTACTACTGCCAACAGTCATACAGCACTCCGATCACTTTC
GGCCAGGGCACCCGGCTCGAAATCAAGCGCGCTGCTGCTTTGGAC
AATGAGAAGTCAAACGGCACCATCATAATGTTAAAGGTAAACA
TCTGTGTCCCTCCCGCTGTTCGCCGCCCTTCAAACCGTTCTGG
GTTCTGGTGGTGGTTCGGAGGCGTACTCGCTTGCTATAGTCTGCTG
GTAAGTGTGCCTTCATCATCTTTTGGGTGAGATCCAAAAGAAGC
CGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCT
GGCCCCACAAGGAAACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGAT
TTCGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGAT
GCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCT
CAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTTGGACAAGCGCA
GAGGACGGGACCCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAAC
CCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCT
GAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGG
AAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGA
AGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGGT
AA (SEQ ID NO. 81)

АК тяжелой и легкой цепей CAR CD28T CD3 дзета для клона 20C5.1

(Сигнальный пептид выделен жирным шрифтом)

MALPVTALLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKV
SGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVT
VTEDTSTDТАYMEЛSSLRSEDTAVYYCATESRGIGWPYFDYWGGQT
LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS
QSISSYLNWYQQKPGKAPKLLISGASSLKSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLPPEDFATYYCQSYSTPITFGQGTRLEIKRAAALDNEKSNGTIIHV
KGKHLCPSPFLFPGSPKPFVWLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFWVRSK
RSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSA
DAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKN
PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGYQGLSTATK
DTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO. 82)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD28T CD3 дзета для клона 20C5.1

CAGGTCCAАCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTCAAGAAACCAGG
TGCCTCCGTТААAGTGAGTTGCAAAGTCTCTGGATACACTCTGAC
CGAGCTCTCTATGCACTGGGTCCGGCAGGCCCCCGCAAGGGATT
GGAATGGATGGGCGGGTTCGATCCTGAGGACGGAGAGACTATCT
ACGCTCAAAAATTCCAGGGACGAGTGACTGTGACCGAAGACACT
AGTACCGACACTGCCTACATGGAАCTTTCTCTCTGCGATCAGAA
GATACCGCAGTGTACTACTGTGCTACTGAATCTAGGGGCATTGGA
TGGCCCTACTTCGATTACTGGGGTCAGGGAАCTCTGGTGACTGTC
TCCAGCGGTGGAGGTGGCAGCGGTGGTGGCGGAAGCGGGGGGGG
CGGCTCTGATATTCAGATGACTCAATCTCCTTCTCTCTGTCCGCT
TCCGTGGGCGATAGAGTGACCATTACTTGTAGGGCGTCCCAGTCA
ATCTCCAGTTATTTGAATTGGTATCAGCAGAAGCCCGGAAAGCA
CCTAAGCTGTTGATCAGCGGGCTTCTAGCCTGAAGAGTGGGGTA
CCTTCACGGTTCAGCGGAAGCGGAAGCGGAACCGATTTCACCCTG
ACTATCAGCAGCCTGCCACCTGAGGACTTTGCAАCTTACTACTGC
CAACAGTCATACAGCACTCCGATCACTTTCGGCCAGGGCACCCGG
CTCGAAATCAAGCGCGCTGCTGCTTTGGACAATGAGAAGTCAAAC
GGCACCATCATACATGTTAAAGGТАAACATCTGTGTCCCTCCCCG
CTGTTCCCCGGCCCTTCCAAACCGTTCTGGGTTCTGGTGGTGGTTCG

GAGGCGTACTCGCTTGCTATAGTCTGCTGGTAACTGTCGCCTTCAT
 CATCTTTTGGGTGAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGA
 TTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACA
 CTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAG
 CAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCA
 GGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGG
 AAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAG
 ATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCTA
 TAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAAT
 AGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGT
 TTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCT
 CTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGG (SEQ ID NO. 83)

АК тяжелой и легкой цепей CAR CD28 CD3 дзета для клона 20C5.1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGL
 EWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTVTEDTSTDYAMELSSLRSEDY
 AVYYCATESRGIGWPFYFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS
 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSSISYLNWYQKPKGKAPKLLI
 SGASSLKSGVPSRFSGSGSTDFTLTISLPPEDFATYYCQQSYSTPITF
 GQGTRLEIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGSKPFWVLV
 VVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRK
 HYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
 EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG
 MKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO.
 84)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD28 CD3 дзета для клона 20C5.1

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCC
 TGCACGCCGCACGCCCGCAGGTGCAGCTTGTGCAGAGCGGGGCC
 GAGGTGAAGAAGCCCCGGGGCCAGCGTCAAAGTGTCTGTAAAGT
 CAGCGGTTACACCCTCACCGAGCTGAGCATGCACTGGGTACGGCA
 GGCTCCCGGCAAAGGTCTTGAGTGGATGGGTGGATTTGATCCAGA
 AGATGGAGAGACTATCTACGCCAGAAGTCCAGGGCCGGGTCA
 CCGTAACAGAAGACACCTCAACTGACACCGCTTACATGGAGCTGA

GTTCACTGCGGTCCGAGGACACGGCCGTGTATTATTGTGCCACCG
 AGAGCCGCGGAATCGGATGGCCTTACTTCGACTACTGGGGACAGG
 GTACACTTGTTACAGTATCATCCGGGGGTGGCGGCTCTGGTGGGG
 GCGGCTCCGGAGGGGGTGGATCAGATATCCAAATGACTCAAAGT
 CCAAGTTCCTGTCTGCCTCAGTCGGAGATAGAGTCACCATAACC
 TGCAGGGCAAGTCAGTCCATCTCCTCTATCTGAACTGGTACCAA
 CAGAAACCTGGAAAGGCGCCTAAGCTCCTGATCTCCGGAGCCTCA
 TCTTTGAAATCCGGTGTCCATCTCGCTTCAGTGGCTCTGGAAGCG
 GTACAGATTTTACTTTGACCATTAGCAGCCTCCACCCGGAAGACT
 TTGCTACATATTACTGCCAGCAGTCTTACTCAACCCCAATCACCTT
 CGGGCAAGGCACCAGACTCGAAATAAAAAAGAGCAGCTGCTATCG
 AGGTTATGTACCCACCGCCGTAATTGGATAACGAAAAAAGCAATG
 GGACCATCATTGATGTGAAGGTAAGCACCTTTGCCCTAGCCAC
 TGTTTCCTGGCCCGAGTAAACCCTTTTGGGTAATTGTGGTCTGTCGG
 CGGCGTGTGGCCTGCTACTCACTCCTGGTTACCGTCGCATTATC
 ATCTTTTGGGTGAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGAT
 TACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACAC
 TACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTCGCTGCCTATCGGAGC
 AGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAG
 GGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGA
 AGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGA
 TGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCCCAAGGAGGGTCTCTAT
 AATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAAT
 AGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGT
 TTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCT
 CTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGGTAA (SEQ ID NO. 85)

AK тяжелой и легкой цепей CAR CD28 CD3 дзета для клона 20C5.1

(Сигнальный пептид выделен **жирным шрифтом**)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKV
 SGYTLTELSMHWVRQAPGKLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVT
 VTEDTSTDYAYMELSSLRSEDTAVYYCATESRGIGWPYFDYWGQGT
 LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS
 QSISSYLNWYQQKPGKAPKLLISGASSLKSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI

SSLPPEDFATYYCQSYSTPITFGQGRLEIKRAAAIEVMYPPPYLDNE
 KSNGTIIHVKGKHLCPSPFLFPGPSKPFWVVLVVVGGVLACYSLLVTVA
 FIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
 RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM
 GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLY
 QGLST ATKDTYDALH MQALPPR (SEQ ID NO. 86)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD28 CD3 дзета для клона 20C5.1

CAGGTGCAGCTTGTGCAGAGCGGGGCCGAGGTGAAGAAGCCCGG
 GGCCAGCGTCAAAGTGTCTGTAAAGTCAGCGGTTACACCCTCAC
 CGAGCTGAGCATGCACTGGGTACGGCAGGCTCCCGGCAAAGTCT
 TGAGTGGATGGGTGGATTTGATCCAGAAGATGGAGAGACTATCTA
 CGCCCAGAAGTTCCAGGGCCGGGTACCGTAACAGAAGACACCT
 CAACTGACACCGCTTACATGGAGCTGAGTTCAGTCCGGTCCGAGG
 ACACGGCCGTGTATTATTGTGCCACCGAGAGCCGCGGAATCGGAT
 GGCCTTACTTCGACTACTGGGGACAGGGTACACTTGTACAGTAT
 CATCCGGGGGTGGCGGCTCTGGTGGGGGGCGGCTCCGGAGGGGGT
 GGATCAGATATCCAAATGACTCAAAGTCCAAGTTCCTGTCTGCC
 TCAGTCGGAGATAGAGTACCATAACCTGCAGGGCAAGTCAGTCC
 ATCTCCTCTATCTGAACTGGTACCAACAGAAACCTGGAAGGCG
 CCTAAGCTCCTGATCTCCGGAGCCTCATCTTTGAAATCCGGTGTCC
 CATCTCGCTTCAGTGGCTCTGGAAGCGGTACAGATTTTACTTTGAC
 CATTAGCAGCCTCCCACCGAAGACTTTGCTACATATTACTGCCA
 GCAGTCTTACTCAACCCAATCACCTTCGGGCAAGGCACCAGACT
 CGAAATAAAAAGAGCAGCTGCTATCGAGGTTATGTACCCACCGCC
 GTACTTGGATAACGAAAAAAGCAATGGGACCATTCATCATGTGAA
 GGGTAAGCACCTTTGCCCTAGCCCACTGTTTCCTGGCCCCGAGTAA
 ACCCTTTTGGGTACTTGTGGTCGTCGGCGGCGTGTGGCCTGTACT
 TCACTCCTGGTTACCGTCGCATTCATCATCTTTTGGGTGAGATCCA
 AAAGAAGCCGCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCAC
 GCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACTACCAGCCTTACGCACCAC
 CTAGAGATTTGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGAT
 CTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATA
 ACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGAC

AAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACG
AAAAAACCCCAAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATA
AGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGG
AGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCAC
TGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCC
ACCTAGG (SEQ ID NO. 87)

АК тяжелой и легкой цепей CAR CD28 CD3 дзета для клона 20C5.1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGL
EWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTVTEDTSTDTAYMELSSLRSED
AVYYCATESRGIGWPYFDYWQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGS
DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
SGASSLKSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPPEDFATYYCQSYSTPITF
GQGTRLEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFP
PSKPFWVLLVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMN
TPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNL
YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD
KMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHM
QALPPR (SEQ ID NO. 88)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD8 CD3 дзета для клона 20C5.1

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCTGCGGTTGGCATTGCTCC
TGCACGCCGCACGCCGCAGGTGCAGTTGGTGCAAAGCGGCGCA
GAAGTTAAGAAACCTGGGGCGTCAGTTAAGGTGTCTTGCAAAGTA
TCTGGCTATACCCTCACTGAGCTGTCCATGCATTGGGTAAGGCAG
GCTCCTGGAAAGGGGCTCGAATGGATGGGAGGATTTGACCCTGA
AGACGGAGAGACCATCTACGCCAGAAATCCAGGGTAGAGTAA
CAGTGAAGTGAAGGACACTAGCACTGACACAGCGTACATGGAGCTG
AGTTCTCTGAGAAGTGAGGACACAGCCGTTTACTACTGCGCTACC
GAGTCCAGAGGTATTGGCTGGCCATACTTCGACTATTGGGGTCAG
GGCACCTGGTTACAGTGAGTTCAGGAGGCGGGGGCTCTGGGGG
GGGCGGTTCCGGAGGGGGGGGCTCAGATATACAGATGACGCAGA
GTCCATCAAGTCTCTCAGCCAGCGTGGGAGATCGCGTGAATTA
CTTGCCGCGCCAGCCAGAGTATTAGCTCCTATCTGAATTGGTACC

AGCAAAAGCCCGGAAGGCCCTAAGCTTCTGATTTCTGGCGCCT
 CCTCTTTGAAGTCAGGTGTGCCAAGCAGATTTAGCGGGTCTGGAA
 GTGGCACTGACTTTACTTACTATCTCCAGCCTGCCCCAGAGG
 ATTTTGCCACATATTACTGTCAGCAAAGCTACTCTACTCCAATCAC
 TTTCGGCCAGGGCACAAGATTGGAGATTAAGAGGGCTGCCGCACT
 TTCAAATTCCATCATGTATTTAGCCATTTTGTGCCTGTTTTTCTTC
 CGGCCAAACCTACAACCACTCCC GCCCCACGCCACCTACTCCC
 CCCCTACCATTGCCTCCAGCCTCTGTCTCTTAGACCTGAGGCTTG
 TAGACCTGCTGCCGGCGGAGCCGTGCACACTCGCGGTCTGGACTT
 CGCCTGCGACATCTATATCTGGGCCCTCTGGCCGGCACCTGCGG
 CGTTCTCCTTCTCTCACTCGTAATCACACTCTATTGCAATCACAGG
 AACAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAAT
 ATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACTACCAGCCT
 TACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAG
 TTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAAC
 CAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGA
 CGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCA
 AACCAAGACGAAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTG
 CAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAA
 AGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGG
 GACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGC
 AAGCCCTGCCACCTAGGTAA (SEQ ID NO. 89)

AK тяжелой и легкой цепей CAR CD8 CD3 дзета для клона 20C5.1

(Сигнальный пептид выделен **жирным шрифтом**)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKV
 SCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVT
 VTEDTSTDATYMESSLRSEDTAVYYCATESRGIGWPYFDYWGQGT
 LTVVSSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS
 QSISSYLNWYQQKPGKAPKLLISGASSLKSGVPSRFSGSGS
 GDTFTLTISSLPPEDFATYYCQQSYSTPITFGQGRLEIKRAAALS
 NSIMYFSHFVPLFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPA
 AGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRS
 RLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAY
 QQGQNQLY

NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK
MAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPP
R (SEQ ID NO. 90)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD8 CD3 дзета для клона 20C5.1

CAGGTGCAGTTGGTGCAAAGCGGCGCAGAAGTTAAGAAACCTGG
GGCGTCAGTTAAGGTGTCTTGCAAAGTATCTGGCTATACCCCTCAC
TGAGCTGTCCATGCATTGGGTAAGGCAGGCTCCTGGAAAGGGGCT
CGAATGGATGGGAGGATTTGACCCTGAAGACGGAGAGACCATCT
ACGCCCAGAAATTCAGGGTAGAGTAACAGTGAAGTACTGAGGACACT
AGCACTGACACAGCGTACATGGAGCTGAGTTCTCTGAGAAGTGAG
GACACAGCCGTTTACTACTGCGCTACCGAGTCCAGAGGTATTGGC
TGGCCATACTTCGACTATTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTTACAGTG
AGTTCAGGAGGGCGGGGGCTCTGGGGGGGGCGGTTCCGGAGGGGG
GGGCTCAGATATACAGATGACGCAGAGTCCATCAAGTCTCTCAGC
CAGCGTGGGAGATCGCGTGAAGTACTTACTTCCGCGCCAGCCAGAG
TATTAGCTCCTATCTGAATTGGTACCAGCAAAGCCCGGAAGGC
CCCTAAGCTTCTGATTTCTGGCGCCTCCTCTTGAAGTCAGGTGTG
CCAAGCAGATTTAGCGGGTCTGGAAGTGGCACTGACTTTACACTT
ACTATCTCCAGCCTGCCCCAGAGGATTTTGCCACATATTACTGTC
AGCAAAGCTACTCTACTCCAATCACTTTCCGGCCAGGGCACAAGAT
TGGAGATTAAGAGGGCTGCCGCACTTCAAATTCCATCATGTATT
TCAGCCATTTTGTGCCTGTTTTCTTCCGGCCAAACCTACAACCAC
TCCCGCCCCACGCCACCTACTCCCGCCCTACCATTGCCTCCAG
CCTCTGTCTCTTAGACCTGAGGCTTGTAGACCTGCTGCCGGCGGA
GCCGTGCACACTCGCGGTCTGGACTTCGCCTGCGACATCTATATCT
GGGCCCCCTCTGGCCGGCACCTGCGGCGTTCTCCTTCTCTCACTCGT
AATCACACTCTATTGCAATCACAGGAACAGATCCAAAAGAAGCC
GCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTG
GCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATT
TCGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTTCCAGATCTGCAGATG
CACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTC
AACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAG
AGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCC

CCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCT
 GAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGG
 AAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGA
 AGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGG
 (SEQ ID NO. 91)

АК тяжелой и легкой цепей CAR CD8 CD3 дзета для клона 20C5.1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGL
 EWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTVTEDTSTDYAYMELSSLRSEDY
 AVYYCATESRGIGWPFYDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGS
 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQKPKAPKLLI
 SGASSLKSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLPPEDFATYYCQSYSTPITF
 GQGTRLEIKRAAALSNSIMYFSHFVFPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIA
 SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSL
 VITLYCNHRNRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDF
 AAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG
 RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
 HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO. 92)

ДНК HC для клона 20C5.2

CAGGTCCAGTTGGTCGAAAGTGGCGGTGGTGTAGTGCAGCCGGGC
 CGCAGTTTGAGGCTTTCCTGTGCGGCTTCAGGCTTTACTTTTTCCA
 GCTATGGAATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCCCGCAAAGGACTT
 GAGTGGGTGGCCGTCATTTCTTATGACGGATCAGATAAGTACTAC
 GTGGACAGCGTCAAGGGCAGATTCACCATCTCTAGGGACAACAGT
 AAAAATAGACTCTACCTCCAGATGAATAGCCTCAGAGCTGAAGAC
 ACGGCCGTCTACTATTGTGCTCGGGAGCGGTATAGTGGCAGAGAC
 TACTGGGGGCAGGGCACACTCGTTACAGTGAGTAGC (SEQ ID NO.
 93)

АК HC для клона 20C5.2 (CDR отмечены подчеркиванием)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE
 WVAVISYDGS^UDKYYVDSVKGRFTISRDN^USKNRLYLQMNSLRAEDTA
 VYYCAR^UERYSGRDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO. 94)

АК CDR1 HC для клона 20C5.2: GFTFSSY (SEQ ID NO. 95)

АК CDR2 HC для клона 20C5.2: SYDGSD (SEQ ID NO. 96)

АК CDR3 HC для клона 20C5.2: ERYSGRDY (SEQ ID NO. 97)

ДНК LC для клона 20C5.2

GAGATTGTTATGACCCAGAGTCCTGCGACCCCTCAGTCAGCCCC
GGGGAGCGCGCAACTTTGTCTTGCAGAGCTAGTCAGTCCGTGTCC
TCTTCTGACATGGTACCAGCAAAAGCCCGGGCAGGCTCCGCGC
CTTTGATCTTTGGGGCTTCAACAAGAGCCACTGGGATTCCCGCA
CGATTCTCTGGCTCCGGGAGCGGTAAGTGGTTTACCCCTGACGATT
AGCAGTCTCCAGAGCGAGGACTTCGCCGTATACTACTGCCAGCAG
TACGATACGTGGCCATTCACTTTTGGACCAGGACTAAAGTGGAT
TTAAGCGC (SEQ ID NO. 98)

АК LC для клона 20C5.2 (CDR отмечены подчеркиванием)

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSLLTWYQQKPGQAPRLLI
FGASTRATGIPARFSGSGSGTGFSLTISLQSEDFAVYYCQQYDTWPF
TFGPGTKVDFKR (SEQ ID NO. 99)

АК CDR1 LC для клона 20C5.2: RASQSVSSLLT (SEQ ID NO. 100)

АК CDR2 LC для клона 20C5.2: GASTRAT (SEQ ID NO. 101)

АК CDR3 LC для клона 20C5.2: QQYDTWPFT (SEQ ID NO. 102)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD28T CD3 дзета для клона 20C5.2

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCC
TGCACGCCGCACGCCCGCAGTCCAGTTGGTCGAAAGTGGCGGTG
GTGTAGTGCAGCCGGGCCGAGTTTGAGGCTTTCCTGTGCGGCTT
CAGGCTTTACTTTTTCCAGCTATGGAATGCACTGGGTGCGGCAGG
CCCCGGCAAAGGACTTGAGTGGGTGGCCGTCATTTCTTATGACG
GATCAGATAAGTACTACGTGGACAGCGTCAAGGGCAGATTCACC
ATCTCTAGGGACAACAGTAAAAATAGACTCTACCTCCAGATGAAT
AGCCTCAGAGCTGAAGACACGGCCGTCTACTATTGTGCTCGGGAG
CGGTATAGTGGCAGAGACTACTGGGGCAGGGCACACTCGTTAC

AGTGAGTAGCGGCGGAGGAGGGAGTGGGGGCGGTGGCTCCGGTG
 GAGGAGGTTCTGAGATTGTTATGACCCAGAGTCCTGCGACCCTCT
 CAGTCAGCCCCGGGGAGCGCGCAACTTTGTCTTGCAGAGCTAGTC
 AGTCCGTGTCCTCTCTCTGACATGGTACCAGCAAAAAGCCCGGGC
 AGGCTCCGCGCCTTTTGATCTTTGGGGCTTCAACAAGAGCCACTG
 GGATTCGCCGACGATTCTCTGGCTCCGGGAGCGGTAAGTGTTC
 CCCTGACGATTAGCAGTCTCCAGAGCGAGGACTTCGCCGTATACT
 ACTGCCAGCAGTACGATACGTGGCCATTCACCTTTTGGACCAGGGA
 CTAAAGTGGATTTTAAGCGCGCCCGCTCTCGATAACGAAAAGT
 CAAATGGCACCATAATCCACGTCAAAGGCAAGCACCTGTGCCCTT
 CCCCCTCTTCCCCGGACCCAGTAAACCATTTTGGGTGCTGGTTGT
 TGTGGGGGGCGTGCTGGCCTGCTATAGCCTTTTGGTCACTGTAGC
 CTTCATTATTTTTTGGGTCAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCAT
 AGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGG
 AAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTCGCTGCCTAT
 CGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTAT
 CAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACG
 CAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACC
 CTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCCCAAGGAGGT
 CTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCT
 GAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACG
 ACGTTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATG
 ACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGGTAA (SEQ ID NO.
 103)

AK тяжелой и легкой цепей CAR CD28T CD3 дзета для клона 20C5.2

(Сигнальный пептид выделен **жирным шрифтом**)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA
 SGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGSCKYYVDSVKGRFTI
 SRDNSKNRLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERYSGRDYWGQGLVTV
 SSGGGSGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSS
 LLTWYQQKPGQAPRLLIFGASTRATGIPARFSGSGSGTGFTLTISSLS
 EDFAVYYCQYDTPFTFGPGTKVDFKRAAALDNEKSNGTIIHVKG
 KHLCPSPFPGPSKPFWVLLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSR

LLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAP
AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE
GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATK
DTYDALHMQUALPPR (SEQ ID NO. 104)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD28T CD3 дзета для клона 20C5.2
CAGGTCCAGTTGGTCGAAAGTGGCGGTGGTGTAGTGCAGCCGGGC
CGCAGTTTGAGGCTTTCCTGTGCGGCTTCAGGCTTACTTTTTCCA
GCTATGGAATGCACTGGGTGCGGCAGCCCCGGCAAAGGACTT
GAGTGGGTGGCCGTCATTTCTTATGACGGATCAGATAAGTACTAC
GTGGACAGCGTCAAGGGCAGATTCACCATCTCTAGGGACAACAGT
AAAAATAGACTCTACCTCCAGATGAATAGCTCAGAGCTGAAGAC
ACGGCCGTCTACTATTGTGCTCGGGAGCGGTATAGTGGCAGAGAC
TACTGGGGGCAGGGCACACTCGTTACAGTGAGTAGCGGCGGAGG
AGGGAGTGGGGCGGTGGCTCCGGTGGAGGAGTTCTGAGATTG
TTATGACCCAGAGTCCTGCGACCCTCTCAGTCAGCCCCGGGGAGC
GCGCAACTTTGTCTTGCAGAGCTAGTCAGTCCGTGTCCTCTCTTCT
GACATGGTACCAGAAAAGCCCCGGGCAGGCTCCGCGCCTTTTGAT
CTTTGGGGCTTCAACAAGAGCCACTGGGATTCCCGCACGATTCTC
TGGCTCCGGGAGCGGTAAGTGGTTTACCCTGACGATTAGCAGTCT
CCAGAGCGAGGACTTCGCCGTATACTACTGCCAGCAGTACGATAC
GTGGCCATTCACTTTTGGACCAGGGACTAAAGTGGATTTAAGCG
CGCCGCCGCTCTCGATAACGAAAAGTCAAATGGCACCATAATCCA
CGTCAAAGGCAAGCACCTGTGCCCTTCCCCGCTCTTCCCCGGACC
CAGTAAACCATTTTGGGTGCTGGTTGTTGTGGGGGGCGTGCTGGC
CTGCTATAGCCTTTTGGTCACTGTAGCCTTCATTATTTTTTGGGTC
AGATCCAAAAGAAGCCGCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATG
ACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACTACTACCAGCCTTAC
GCACCACCTAGAGATTTGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTT
TCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCA
ACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACG
TTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAA
CCAAGACGAAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCA
GAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAG

GAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGA
 CTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAA
 GCCCTGCCACCTAGG (SEQ ID NO. 105)

АК тяжелой и легкой цепей CAR CD28T CD3 дзета для клона 20C5.2

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE
 WVAVISYDGSVKYVDSVKGRFTISRDNNSKNRLYLQMNSLRAEDTA
 VYYCARERYSGRDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMT
 QSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSLLTWYQQKPGQAPRLLIFGAST
 RATGIPARFSGSGSGTGTFTLTISSLSQSEDFAVYYCQQYDTWPFTFGPG
 TKVDFKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWLVVW
 GGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHY
 QPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY
 DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELOKDKMAEAYSEIGMK
 GERRRGKGHDLGYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO.
 106)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD28 CD3 дзета для клона 20C5.2

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCC
 TGCACGCCGCACGCCCGCAGGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGCGGCG
 GCGTGGTCCAGCCCGCCGGTCCCTGCGCCTGTCTGCGCCGCCA
 GCGGGTTTACTTTTTCTCTCTACGGCATGCACTGGGTGCGCCAGGC
 TCCCGCAAGGGCCTCGAGTGGGTGCGCGTGATCTCATAACGATGG
 GTCAGACAAATACTATGTCGATTCTGTAAAGGGCGGTTTACCAT
 TTCAAGAGATAACTCTAAGAATAGGCTGTATTTGCAGATGAACAG
 CCTGAGGGCTGAAGATACCGCAGTGTACTATTGCGCTAGGGAGCG
 GTATAGTGGCCGCGATTACTGGGGACAGGGTACACTGGTGACCGT
 GAGCTCTGGGGGTGGCGGAAGCGGGGGTGGCGGAAGCGGCGGAG
 GGGGTAGTGAAATTGTGATGACCCAGTCTCCGGCTACACTTTCAG
 TCTCCCCTGGGGAGAGAGCTACACTGTCATGCAGAGCGTCCCAGT
 CCGTCTCTTCTCTCCTTACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGC
 TCCTCGACTGCTGATCTTCGGTGCCTCCACAAGGGCGACCGGGAT
 TCCAGCCCGCTTCTCAGGTTCTGGGAGCGGAACTGGTTTCACTTTG
 ACAATCAGTTCACTGCAGTCAGAGGATTCGCCGTGTACTIONTGC

CAGCAATACGACACATGGCCATTCACCTTCGGACCCGGTACCAAA
 GTCGATTTCAAGAGAGCCGCGGCCATCGAGGTTATGTACCCACCA
 CCATATCTGGACAATGAAAAAAGCAATGGAACCATTATCCATGTG
 AAGGGTAAACACCTCTGCCCTAGCCCACTTTTCCCTGGCCCATCA
 AAGCCCTTCTGGGTCTTGGTGGTCGTGGGGGGTGTGCTGGCCTGT
 TACAGCCTTCTGGTGACGGTTGCTTTCATTATCTTCTGGGTTAGAT
 CCAAAGAAGCCGCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTC
 CACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCAC
 CACCTAGAGATTTGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCA
 GATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGT
 ATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTG
 GACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAG
 ACGAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGG
 ATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAG
 CGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAG
 CACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCT
 GCCACCTAGGTAA (SEQ ID NO. 107)

АК тяжелой и легкой цепей CAR CD28 CD3 дзета для клона 20C5.2

(Сигнальный пептид выделен жирным шрифтом)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA
 SGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSVKYYVDSVKGRFTI
 SRDNSKNRLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERYSGRDYWGQGLVTV
 SSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSS
 LLTWYQQKPGQAPRLLIFGASTRATGIPARFSGSGSGTGFTLTISLQS
 EDFAVYYCQYDTPFTFGPGTKVDFKRAAAIEVMYPPPYLDNEKS
 NGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWLVVGGVLACYSLLVTVAFII
 FWVRSKRSLRHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRV
 KFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPEMGG
 KPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQG
 LSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO. 108)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD28 CD3 дзета для клона 20C5.2

CAGGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGCGGGCGGCTGGTCCAGCCCGGC
CGGTCCCTGCGCCTGTCCTGCGCCGCCAGCGGGTTTACTTTTTCT
CCTACGGCATGCACTGGGTGCGCCAGGCTCCCGGCAAGGGCCTCG
AGTGGGTCGCCGTGATCTCATACGATGGGTGAGACAAATACTATG
TCGATTCTGTAAAGGGCGGTTTACCATTCAAGAGATAACTCTA
AGAATAGGCTGTATTTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAAGAT
ACCGCAGTGTACTATTGCGCTAGGGAGCGGTATAGTGGCCGCGAT
TACTGGGGACAGGGTACACTGGTGACCGTGAGCTCTGGGGGTGGC
GGAAGCGGGGGTGGCGGAAGCGGCGGAGGGGGTAGTGAAATTGT
GATGACCCAGTCTCCGGCTACACTTTCAGTCTCCCCTGGGGAGAG
AGCTACACTGTCATGCAGAGCGTCCCAGTCCGTCTCTTCTCTCCTT
ACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTCGACTGCTGATC
TTCGGTGCCTCCACAAGGGCGACCGGGATTCCAGCCCGCTTCTCA
GGTTCTGGGAGCGGAACTGGTTTCACTTTGACAATCAGTTCACTG
CAGTCAGAGGATTCGCCGTGTAATACTGCCAGCAATACGACACA
TGCCATTCACTTTCGGACCCGGTACCAAAGTCGATTTCAAGAGA
GCCGCGCCATCGAGGTTATGTACCCACCACCATATCTGGACAAT
GAAAAAAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAGGGTAAACACCT
CTGCCCTAGCCCACTTTTCCCTGGCCCATCAAAGCCCTTCTGGGTC
TTGGTGGTTCGTGGGGGGTGTGCTGGCCTGTTACAGCCTTCTGGTG
ACGGTTGCTTTTATTATCTTCTGGGTTAGATCCAAAAGAAGCCGC
CTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGC
CCCACAAGGAAACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTTC
GCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCA
CCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTCAA
CCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAG
GACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCCC
CAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGA
AGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAA
AAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAG
GATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGG

(SEQ ID NO. 109)

АК тяжелой и легкой цепей CAR CD28 CD3 дзета для клона 20C5.2

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE
WVAVISYDGS DKYYVDSVKGRFTISRDN SKNRLYLQMN SLRAEDTA
VYYCARERYSGRDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMT
QSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSLLTWYQKPGQAPRLLIFGAST
RATGIPARFSGSGSGTGFTLTISSLQSEDFAVYYCQYDTWPFTFGPG
TKVDFKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSK
PFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPR
RPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE
LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKDMA
EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
(SEQ ID NO. 110)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD8 CD3 дзета для клона 20C5.2

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCC
TGCACGCCGCACGCCCGCAGGTGCAGTTGGTTGAATCAGGAGGG
GGTGTGGTGCAACCCGGTCGGTCACTGCGCCTCAGTTGTGCTGCT
TCCGGGTTTACTTTCAGCTCATATGGGATGCACTGGGTACGGCAG
GCTCCAGGTAAGGCTTGAATGGGTGGCGGTGATCAGCTATGAC
GGCTCTGACAAATATTATGTGGACTCCGTGAAAGGCAGATTCACC
ATCAGTCGAGACAAC TCAAAGAATAGACTCTACTTGCAGATGAAT
AGCCTCCGGGCCGAAGATACTGCAGTCTATTATTGCGCCCGGGAG
CGCTACAGTGGAAGAGACTATTGGGGGCAAGGAAC TTTGTCA
GTCTCATCTGGCGGCGGCGCAGCGGTGGGGGCGGATCTGGCGG
GGGCGGCAGCGAAATCGTTATGACTCAGAGTCCTGCCACACTGAG
CGTTAGCCCTGGTGAGAGCAACACTTAGCTGCAGAGCTAGTCA
GAGTGTTCAGTCTTTTGACATGGTACCAACAGAAGCCCGGTCA
AGCTCCACGACTGCTCATCTTCGGTGCATCCACCCGCGCAACCGG
GATACCCGCCCGGTTTTCCGGTCTGGAAGTGGCACAGGATTCAC
GCTCACCATTCTCTCTGCAGTCTGAAGACTTTGCCGTGTATTAC
TGCCAGCAGTACGATACCTGGCCCTTACCTTTGGCCCAGGTA
CTAAAGTGGATTTTAAACGAGCTGCTGCACTTTCCAATAGTATTATG
TACTTTTACATTTTGTGCCCGTGTTCCTGCCTGCGAAGCCTACGA
CAACCCAGCCCTAGGCCGCCACACCGGCCCAACTATTGCCT

CCCAGCCATTGTCTCTGAGACCCGAAGCTTGCAGACCTGCTGCTG
 GAGGCGCCGTTACACCCGAGGATTGGATTTTCGCATGTGACATTT
 ACATCTGGGCCCCCTTTGGCCGGAACCTGCGGTGTGCTGCTGCTGT
 CACTCGTGATTACACTTTACTGCAACCACCGAAACAGATCCAAAA
 GAAGCCGCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCC
 GCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTA
 GAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTG
 CAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAAC
 GAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAA
 GCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAA
 AAAACCCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAG
 ATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAG
 AAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACTG
 CTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCAC
 CTAGGTAA (SEQ ID NO. 111)

АК тяжелой и легкой цепей CAR CD8 CD3 дзета для клона 20C5.2

(Сигнальный пептид выделен **жирным шрифтом**)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA
 SGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS DKYYVDSVKGRFTI
 SRDNSKNRLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERYSGRDYWGGLVTVS
 SGGGGSGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSS
 LLTWYQQKPGQAPRLLIFGA STRATGIPARFSGSGSGTGFLLTISLQS
 EDFAVYYCQQYDTWPF TFGPGTKVDFKRAAALSNSIMYFSHFVPVFL
 PAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC
 DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLLHSDYMNMPR
 RPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE
 LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA
 EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
 (SEQ ID NO. 112)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD8 CD3 дзета для клона 20C5.2

CAGGTGCAGTTGGTTGAATCAGGAGGGGGTGTGGTGCAACCCGGT
CGGTCACTGCGCCTCAGTTGTGCTGCTTCCGGGTTTACTTTTCAGCT
CATATGGGATGCACTGGGTACGGCAGGCTCCAGGTAAAGGCTTGG
AATGGGTGGCGGTGATCAGCTATGACGGCTCTGACAAATATTATG
TGGACTCCGTGAAAGGCAGATTCACCATCAGTCGAGACAACCTCAA
AGAATAGACTCTACTTGCAGATGAATAGCCTCCGGGCCGAAGATA
CTGCAGTCTATTATTGCGCCCCGGGAGCGCTACAGTGGAAGAGACT
ATTGGGGGCAAGGAACCTTGTACAGTCTCATCTGGCGGGCGGCG
GCAGCGGTGGGGGCGGATCTGGCGGGGGCGGCAGCGAAATCGTT
ATGACTCAGAGTCCTGCCACACTGAGCGTTAGCCCTGGTGAGAGA
GCAACACTTAGCTGCAGAGCTAGTCAGAGTGTTTCCAGTCTTTTG
ACATGGTACCAACAGAAGCCCGGTCAAGCTCCACGACTGCTCATC
TTCGGTGCATCCACCCGCGCAACCGGGATACCCGCCCGGTTTTCC
GGTTCTGGAAGTGGCACAGGATTCACGCTACCATTTCTTCTCTGC
AGTCTGAAGACTTTGCCGTGTATTACTGCCAGCAGTACGATACCT
GGCCCTTTACCTTTGGCCCAGGTAATAAGTGGAATTTTAAACGAG
CTGCTGCACTTTCCAATAGTATTATGTACTTTTTCACATTTTGTGCC
CGTGTTCCTGCCTGCGAAGCCTACGACAACCCAGCCCCTAGGCC
GCCACACCCGGCCCCAACTATTGCCTCCCAGCCATTGTCTCTGAG
ACCCGAAGCTTGCAGACCTGCTGCTGGAGGCGCCGTTACACCCCG
AGGATTGGATTTTCGCATGTGACATTTACATCTGGGCCCCTTTGGCC
GGAACCTGCGGTGTGCTGCTGCTGTCACTCGTGATTACACTTTACT
GCAACCACCGAAACAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGC
GATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAA
CACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGG
AGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAG
CAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAG
GGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTG
AGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAACCCCAAGGAGGGTCTC
TATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAA
ATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACG
GTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACG
CTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGG (SEQ ID NO. 113)

АК тяжелой и легкой цепей CAR CD8 CD3 дзета для клона 20C5.2

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE
WVAVISYDGS DKYYVDSVKGRFTISRDN SKNRLYLQMN SLRAEDTA
VYYCARERYSGR DYWGQTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSEIVMT
QSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSLLTWYQQKPGQAPRLLIFGAST
RATGIPARFSGSGSGTGFSLTISLQSEDFAVYYCQQYDTWPF TFGPG
TKVDFKRAAALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQP
LSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITL
YCNHRNRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYR
SRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPE
MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGL
YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO. 114)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD28T CD3 дзета для клона 20C5.2

ATGGCACTCCCCGTA ACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCC
TGCACGCCGCACGCCCGGAGATTGTGATGACCCAGTCCCCTGCTA
CCCTGTCCGTCAGTCCGGGCGAGAGAGCCACCTTGTCATGCCGGG
CCAGCCAGTCCGTCAGCAGTCTCCTGACTTGGTATCAGCAAAAAC
CAGGGCAGGCACCGCGGCTTTTGATTTTGGTGCAAGCACACGCG
CCACTGGCATTCCAGCTAGGTTTTCTGGAAGTGGATCTGGGACAG
GCTTCACTCTGACAATCAGTAGCCTGCAGAGTGAGGACTTTGCTG
TTTACTACTGTCAACAGTACGACACCTGGCCATTCACATTCGGGC
CCGGCACCAAGGTCGACTTCAAGAGGGGCGGTGGAGGTTCAAGT
GGTGGCGGGTCAGGCGGCGGTGGTCTCAGGTTCAACTGGTGGAA
ATCAGGTGGCGGCGTTGTCCAACCGGGGCGATCACTTCGACTTTC
CTGTGCTGCCTCAGGCTTTACTTTTTTCATCCTATGGGATGCACTGG
GTTCCGGCAGGCTCCCGGAAAAGGACTCGAGTGGGTTGCAGTGATC
TCTTACGATGGCTCAGACAAGTATTATGTGGACTCAGTCAAGGGG
AGATTCACAATAAGCCGAGACA ACTCCAAAACCGGCTTTATCTC
CAGATGAACAGCCTTAGAGCGGAAGATACCGCGGTATACTACTGT
GCCCCGAGAGGTATTCCGGCAGAGACTACTGGGGACAGGGCAC
ACTGGTACCGTGAGTTCTGCCGAGCGCTCGATAACGAAAAGAG
CAACGGAACCATTATCCACGTTAAGGGCAAGCACCTGTGCCCCAG
TCCCCTCTCCCAGGACCATCTAAACCCTTCTGGGTTCTGGTAGTA

GTTGGAGGGGTCCTTGCATGTTACTCCCTTTTGGTCACCGTCGCCT
 TCATTATTTTCTGGGTGAGATCCAAAAGAAGCCGCTGCTCCATA
 GCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGA
 AACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATC
 GGAGCAGGGTGAAGTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATC
 AGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGC
 AGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCC
 TGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCCCAAGGAGGGTC
 TCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTG
 AAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGA
 CGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGA
 CGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGGTAA (SEQ ID NO. 115)

АК тяжелой и легкой цепей CAR CD28T CD3 дзета для клона 20C5.2

(Сигнальный пептид выделен жирным шрифтом)

MALPVTALLPLALLHAARPEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRA
 SQSVSLLTWYQQKPGQAPRLIFGASTRATGIPARFSGSGSGTGFTL
 TISSLQSEDFAVYYCQYDTWPFYFGPGTKVDFKRGSGSGSGSG
 GGGSQVLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPG
 KGLEWVAVISYDGSVKYVDSVKGRFTISRDNKRNLYLQMNSLRA
 EDTAVYYCARERYSGRDYWGQGLVTVSSAAALDNEKSNGTIIHVK
 GKHLCPSPFPGPSKPFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRKRS
 RLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADA
 PAYQQQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ
 EGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDT
 YDALHMQALPPR (SEQ ID NO. 116)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD28T CD3 дзета для клона 20C5.2

GAGATTGTGATGACCCAGTCCCCTGCTACCCTGTCCGTCAGTCCG
 GGCGAGAGAGCCACCTTGTCATGCCGGGCCAGCCAGTCCGTCAGC
 AGTCTCCTGACTTGGTATCAGCAAAAACCAGGGCAGGCACCGCGG
 CTTTGTATTTTGGTGCAAGCACACGCCCACTGGCATTCCAGCTA
 GGTTTTCTGGAAGTGGATCTGGGACAGGCTTCACTCTGACAATCA
 GTAGCCTGCAGAGTGAGGACTTTGCTGTTTACTACTGTCAACAGT

ACGACACCTGGCCATTACATTCGGGCCCCGGCACCAAGGTCGACT
 TCAAGAGGGGCGGTGGAGGTTACAGGTGGTGGCGGGTCAGGCGGC
 GGTGGGTCTCAGGTTCAACTGGTGAATCAGGTGGCGGCGTTGTC
 CAACCGGGGCGATCACTTCGACTTTCCTGTGCTGCCTCAGGCTTTA
 CTTTTTCATCCTATGGGATGCACTGGGTTCGGCAGGCTCCCGGAA
 AAGGACTCGAGTGGGTTGCAGTGATCTTTACGATGGCTCAGACA
 AGTATTATGTGGACTCAGTCAAGGGGAGATTCACAATAAGCCGAG
 ACAACTCCAAAAACCGGCTTTATCTCCAGATGAACAGCCTTAGAG
 CGGAAGATAACCGCGGTATACTACTGTGCCCGGAGAGGTATCCG
 GCAGAGACTACTGGGGACAGGGCACACTGGTCACCGTGAGTTCTG
 CCGCAGCGCTCGATAACGAAAAGAGCAACGGAACCATTATCCAC
 GTTAAGGGCAAGCACCTGTGCCCCAGTCCCCTCTTCCAGGACCA
 TCTAAACCTTCTGGGTTCTGGTAGTAGTTGGAGGGGTCTTGCAT
 GTTACTCCCTTTTGGTCACCGTCGCCTTCATTATTTTCTGGGTGAG
 ATCCAAAAGAAGCCGCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGAC
 TCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACTACCAGCCTTACGC
 ACCACCTAGAGATTTGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTTC
 CAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAAC
 TGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTT
 TGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCA
 AGACGAAAAAACCCCGAGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAA
 GGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAG
 AGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGTTTGTACCAGGGACTC
 AGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCC
 CTGCCACCTAGG (SEQ ID NO. 117)

AK тяжелой и легкой цепей CAR CD28T CD3 дзета для клона 20C5.2
 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSLLTWYQQKPGQAPRLLI
 FGASTRATGIPARFSGSGSGTGFSLTISLQSEDFAVYYCQQYDTWPF
 TFGPGTKVDFKRGGGSGGGGSGGGGSGVQLVESGGGVVQPGRSLR
 LSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS DKYYVDSV
 KGRFTISRDN SKNRLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERYSGRDYWGQ
 GTLVTVSSAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVVLV
 VGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKH

YQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREE
 YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM
 KGERRRGKGHDLGGLSTATKDTYDALHMQUALPPR (SEQ ID NO.
 118)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD28 CD3 дзета для клона 20C5.2

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCC
 TGCACGCCGCACGCCGGAGATCGTCATGACACAGAGTCCAGCTA
 CCCTGAGCGTGTCCCCTGGAGAGAGAGCCACCCTGTCCTGTAGGG
 CTAGTCAGAGTGTGTCCAGCCTCCTCACCTGGTATCAACAGAAGC
 CTGGTCAAGCTCCCCGGCTGCTTATCTTCGGGGCCAGCACGCGAG
 CCACAGGCATCCCGGCCAGATTCTCTGGCTCTGGCAGTGGCACCG
 GGTCACTCTCACGATCTCATCCCTGCAGTCAGAGGATTTGCTGT
 GTATTACTGTCAGCAGTACGATACATGGCCCTTCACCTTCGGCCC
 GGGCACAAAAGTAGATTTCAAGCGCGGCGGGGGTAGTGGGG
 GCGGGGGATCAGGAGGAGGGGGCTCCAAGTACAGCTGGTTGAG
 AGCGGGCGGGGGTGGTTCAGCCCGGGCGCAGCCTCAGGCTGAG
 TTGCGCAGCATCAGGATTCACATTCAGTTCTTATGGAATGCATTG
 GGTCAGACAGGCTCCCGGAAGGGCCTTGAATGGGTGGCAGTCA
 TTAGCTACGACGGAAGCGATAAGTACTATGTGGACTCAGTTAAAG
 GGAGATTTACTATCAGCCGCGACAATTCCAAAACAGATTGTATT
 TGCAGATGAACTCCCTCAGGGCGGAGGACACTGCTGTATATTACT
 GCGCACGAGAGAGATACTCCGGCCGAGACTATTGGGGCCAAGGA
 ACATTGGTAACTGTGAGCTCCGCCGAGCTATTGAGGTCATGTAC
 CCCCCACCTTATCTCGATAATGAGAAGAGTAATGGGACTATAATT
 CACGTAAAGGGCAAACACCTGTGCCCTTCCCCGCTGTTCCAGGT
 CCAAGTAAGCCGTTCTGGGTCCTGGTTGTGGTGGGAGGGGTGCTG
 GCCTGCTATTCTCTGTTGGTTACCGTGGCCTTTATCATTTTCTGGGT
 GAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATAT
 GACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACTACCAGCCTTA
 CGCACCACCTAGAGATTTGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTT
 TTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCA
 ACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACG
 TTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAA

CCAAGACGAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCA
 GAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAG
 GAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGA
 CTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAA
 GCCCTGCCACCTAGGTAA (SEQ ID NO. 119)

АК тяжелой и легкой цепей CAR CD28 CD3 дзета для клона 20C5.2
 (Сигнальный пептид выделен **жирным шрифтом**)

MALPVTALLLPLALLHAARPEIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRA
 SQSVSSLLTWYQQKPGQAPRLIFGASTRATGIPARFSGSGSGTGFTL
 TISSLQSEDFAVYYCQYDTPFTFGPGTKVDFKRGGGGSGGGGSG
 GGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPG
 KGLEWVAVISYDGS DKYYVDSVKGRFTISRDN SKNRLYLQMNSLRA
 EDTAVYYCARERYSGRDYWGQGLVTVSSAAAEVMYPPPYLDNEK
 SNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFVVLVVVGGV LACYSLLVTVAFI
 IFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSR
 VKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG
 GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQ
 GLSTATKD TYDALHMQALPPR (SEQ ID NO. 120)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD28 CD3 дзета для клона 20C5.2
 GAGATCGTCATGACACAGAGTCCAGCTACCCTGAGCGTGTCCCCT
 GGAGAGAGAGCCACCCTGTCCTGTAGGGCTAGTCAGAGTGTGTCC
 AGCCTCCTCACCTGGTATCAACAGAAGCCTGGTCAAGCTCCCCGG
 CTGCTTATCTTCGGGGCCAGCACGCGAGCCACAGGCATCCCCGGC
 AGATTCTCTGGCTCTGGCAGTGGCACCGGGTTCCTCTCACGATCT
 CATCCCTGCAGTCAGAGGATTTGCTGTGTATTACTGTCAGCAGT
 ACGATACATGGCCCTTACCTTCGGCCCCGGGCACAAAAGTAGATT
 TCAAGCGCGGCGGGGGGTAGTGGGGGCGGGGGATCAGGAGGA
 GGGGGCTCCCAAGTACAGCTGGTTGAGAGCGGCGGGGGTGGT
 TCAGCCCCGGGCGCAGCTCAGGCTGAGTTGCGCAGCATCAGGATT
 CACATTCAGTTCTTATGGAATGCATTGGGTGAGACAGGCTCCCCGG
 GAAGGGCCTTGAATGGGTGGCAGTCATTAGCTACGACGGAAGCG
 ATAAGTACTATGTGGACTCAGTTAAAGGGAGATTTACTATCAGCC

GCGACAATTCCAAAAACAGATTGTATTTGCAGATGAACTCCCTCA
 GGGCGGAGGACACTGCTGTATATTACTGCGCACGAGAGAGATACT
 CCGGCCGAGACTATTGGGGCCAAGGAACATTGGTAACTGTGAGCT
 CCGCCGCAGCTATTGAGGTCATGTACCCCCACCTTATCTCGATA
 ATGAGAAGAGTAATGGGACTATAATTCACGTAAAGGGCAAACAC
 CTGTGCCCTTCCCCGCTGTTCCAGGTCCAAGTAAGCCGTTCTGGG
 TCCTGGTTGTGGTGGGAGGGGTGCTGGCCTGCTATTCTCTGTTGGT
 TACCGTGGCCTTTATCATTTTCTGGGTGAGATCCAAAAGAAGCCG
 CCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGG
 CCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTT
 CGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGC
 ACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTCA
 ACCTGGGACGCAGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGA
 GGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACC
 CCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTG
 AAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGA
 AAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAA
 GGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGG
 (SEQ ID NO. 121)

АК тяжелой и легкой цепей CAR CD28 CD3 дзета для клона 20C5.2

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSLLTWYQQKPGQAPRLLI
 FGASTRATGIPARFSGSGSGTGFSLTISSLQSEDFAVYYCQQYDTWPF
 TFGPGTKVDFKRGGGGSGGGSGGGSQVQLVESGGGVVQGRSLR
 LSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGS DKYYVDSV
 KGRFTISRDN SKNRLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERYSGR DYWGQ
 GTLVTVSSAAAEV MYPPPYLDNEK SNGTIIHVKGKHLCP SPLFPGPS
 KPFWVLVVVGGV LACYLLVTVAFIIFWVRSKR S RLLHSDYMN MTP
 RRP GPTRKHYQPY APPRDFAA YRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYN
 ELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM
 AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
 (SEQ ID NO. 122)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD8 CD3 дзета для клона 20C5.2

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCC
TGCACGCCGCACGCCCGAAAATAGTGATGACTCAGTCCCCGGCCA
CCCTCAGCGTGTCCCCGGGGAGCGAGCGACCCTGTCATGCAGGG
CTCCCAGAGTGTGACTCCCTGCTCACTTGGTATCAGCAAAAAGC
CGGGGCAGGCTCCCCGCCTCCTCATCTTCGGGGCATCAACTAGGG
CCACCGGCATTCTGCAAGATTTTCCGGGTCTGGCAGCGGCACCG
GCTTCACCCTTACCATTAGCTCTCTGCAGTCTGAGGACTTCGCCGT
TTACTATTGTCAGCAGTATGATACTTGGCCCTTTACCTTCGGTCCC
GGAAGTAAAGGTGGACTTCAAGCGCGGGGGGGTGGATCTGGAGG
TGGTGGCTCCGGGGGCGGTGGAAGCCAGGTCCAGTTGGTTGAGA
GCGGGCGGCGGAGTGGTGCAGCCCGGAGGTCTTGGCGCTGAGC
TGTGCAGCCTCCGGTTTTACTTTTTCTAGCTATGGAATGCATTGGG
TAAGACAGGCTCCCGGAAAAGGCCTCGAGTGGGTGGCGGTCATT
AGCTATGATGGATCTGATAAATACTATGTGGACTCAGTTAAGGGG
CGCTTCAATCTCAAGAGACAATAGCAAAAATAGACTGTACCTG
CAGATGAATAGTCTGCGCGCCGAGGACACTGCCGTGTAATACTGC
GCCCCGAGAGATACAGCGGACGGGATTACTGGGGCCAGGGTAC
CCTCGTAACGGTGTCTCCGCTGCCGCCCTTAGCAACAGCATTAT
GTACTTTTTCTCATTTTCGTGCCAGTCTTTCTCCAGCAAAGCCCACC
ACTACCCCGGCCCCAGGCCGCTACTCCTGCCCCACTATCGCG
TCTCAGCCTCTCCTTGGCGGCCGAGGCCTGCCGGCCAGCCGCA
GGGGGCGCCGTACATACTCGGGGTTTGGATTTTCGTTGCGACATA
TATATTGGGCCCCCCCTCGCCGGCACATGTGGAGTGTGCTCCTG
AGTCTCGTTATAACCCTCTATTGCAACCATAGAAACAGATCCAAA
AGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGC
CGCCCTGGCCCCACAAGGAAACTACCAGCCTTACGCACCACCT
AGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCT
GCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAA
CGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACA
AGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGA
AAAAACCCCGAGGAGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAA
GATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGA
GAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACT

GCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCA
CCTAGGTAA (SEQ ID NO. 123)

АК тяжелой и легкой цепей CAR CD8 CD3 дзета для клона 20C5.2

(Сигнальный пептид выделен жирным шрифтом)

MALPVTALLLPLALLHAARPEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRA
SQSVSLLTWYQQKPGQAPRLIFGASTRATGIPARFSGSGSGTGFTL
TISSLQSEDFAVYYCQYDTPFTFGPGTKVDFKRGGGGSGGGGSG
GGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPG
KGLEWVAVISYDGSVKYVDSVKGRFTISRDNKSKNRYLQMNSLRA
EDTAVYYCARERYSGRDYWGQGLVTVSSAAALSNSIMYFSHFVVPV
FLPAKPTTTPAPRPPTPARTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA
CDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLHSDYMNMTPT
RRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYN
ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM
AEAYSEIGMKGERRRGKGHGDLGQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
(SEQ ID NO. 124)

ДНК тяжелой и легкой цепей CAR CD8 CD3 дзета для клона 20C5.2

GAAATAGTGATGACTCAGTCCCCGGCCACCCTCAGCGTGTCCCC
GGGGAGCGAGCGACCCTGTCATGCAGGGCTTCCCAGAGTGTGAGC
TCCCTGCTCACTTGGTATCAGCAAAAGCCGGGGCAGGCTCCCCGC
CTCCTCATCTTCGGGGCATCAACTAGGGCCACCGGCATTCCTGCA
AGATTTTCCGGGTCTGGCAGCGGCACCGGCTCACCCCTACCATT
AGCTCTCTGCAGTCTGAGGACTTCGCCGTTTACTATTGTCAGCAGT
ATGATACTTGGCCCTTACCTTCGGTCCCGGAACCTAAGGTGGACTT
CAAGCGCGGGGGGGGTGGATCTGGAGGTGGTGGCTCCGGGGGCG
GTGGAAGCCAGGTCCAGTTGGTTGAGAGCGGCGGGAGTGGTG
CAGCCCGGAGGTCCTTGC GGCTGAGCTGTGCAGCCTCCGTTTT
ACTTTTCTAGCTATGGAATGCATTGGGTAAGACAGGCTCCCGGA
AAAGGCCTCGAGTGGGTGGCGGTCATTAGCTATGATGGATCTGAT
AAATACTATGTGGACTCAGTTAAGGGGCGCTTACAATCTCAAGA
GACAATAGCAAAAATAGACTGTACCTGCAGATGAATAGTCTGCGC
GCCGAGGACACTGCCGTGTA TACTACTGCGCCCGGAGAGATACAGC

GGACGGGATTACTGGGGCCAGGGTACCCTCGTAACGGTGTCTCC
 GCTGCCGCCCTTAGCAACAGCATTATGTACTTTTCTCATTTTCGTGC
 CAGTCTTTCTCCCAGCAAAGCCCACCACTACCCCGGCCCCCAGGC
 CGCCTACTCCTGCCCCACTATCGCGTCTCAGCCTCTCTCCTTGCG
 GCCCGAGGCCTGCCGGCCAGCCGAGGGGGCGCCGTACATACTC
 GGGGTTTGGATTTGCTTGCACATATATATTTGGGCCCCCCTCGC
 CGGCACATGTGGAGTGTCTCCTGAGTCTCGTTATAACCCTCTAT
 TGCAACCATAGAAACAGATCCAAAAGAAGCCGCTGCTCCATAG
 CGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAA
 ACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTGCTGCCTATCG
 GAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCA
 GCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCA
 GGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCT
 GAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCCCAAGGAGGGTCT
 CTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGA
 AATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGAC
 GGTGTGACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGAC
 GCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGG (SEQ ID NO. 125)

АК тяжелой и легкой цепей CAR CD8 CD3 дзета для клона 20C5.2

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSLLTWYQQKPGQAPRLLI
 FGASTRATGIPARFSGSGSGTGFSLTISLQSEDFAVYYCQYDTPWF
 TFGPGTKVDFKRGGGGSGGGGSGGGGQVQLVESGGGVVQPGRSLR
 LSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGS DKYYVDSV
 KGRFTISRDN SKNRLYLQMNSLR AEDTAVYYCARERYSGRDYWGQ
 GTLVTVSSAAALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQ
 PLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVIT
 LYCNHRNRSKR S RLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAY
 RSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPE
 MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGL
 YQGLSTATKDYDALHMQALPPR (SEQ ID NO. 126)

ДНК сигнального пептида CAR

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCC
TGCACGCCGCACGCCCG (SEQ ID NO. 127)

Сигнальный пептид CAR: MALPVTALLPLALLHAARP (SEQ ID
NO. 128)

ДНК линкера G4S scFv

GGCGGTGGAGGCTCCGGAGGGGGGGGCTCTGGCGGAGGGGGCTC
C (SEQ ID NO. 129)

Линкер G4S scFv: GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO. 130)

Дополнительный линкер G4S: GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID
NO. 145)

ДНК линкера Уиглоу scFv

GGGTCTACATCCGGCTCCGGGAAGCCCGGAAGTGGCGAAGGTAG
TACAAAGGGG (SEQ ID NO. 131)

Линкер Уиглоу scFv: GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO.
132)

АК внеклеточного домена CD28

MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLF
SREFRASHKGLDSAVEVCVVYGNYSQQLQVYSKTGFNC DGKLGNE
SVTFYLQNLVYNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHL
PSPLFPGPSKP (SEQ ID NO. 133)

GX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉ (SEQ ID NO: 134)

X₁X₂X₃X₄X₅X₆ (SEQ ID NO: 135)

X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂DY (SEQ ID NO: 136)

X₁ASQX₅X₆X₇X₈X₉LX₁₁ (SEQ ID NO: 137)

X₁ASX₄X₅X₆X₇ (SEQ ID NO: 138)

QQX₃X₄X₅X₆PX₈T (SEQ ID NO: 139)

AK CLL-1 (также известного как CLEC12A)

MSEEVTYADLQFQNSSEMEKIPEIGKFGKAPPAPSHVWRPAALFLT
 LLCLLLIGLGLVLAASFHVTLKIEMKMKMNKLQNISEELQRNISLQLMS
 NMNISKIRNLSTTLQTIATKLCRELYSKEQENKCKPCRRWIWHKD
 SCYFLSDDVQTWQESKMACAAQNASLLKINNKNLEFIKSQSRSYD
 YWLGLSPEEDSTRGMRVDNIINSSAWVIRNAPDLNNMYCGYINRLY
 VQYYHCTYKCRMICEKMANPVQLGSTYFREA (SEQ ID NO. 140)

Нуклеотидная последовательность 4-1BB (внутриклеточный домен)

AAGCGCGGCAGGAAGAAGCTCCTCTACATTTTTAAGCAGCCTTTT
 ATGAGGCCCGTACAGACAACACAGGAGGAAGATGGCTGTAGCTG
 CAGATTTCCCGAGGAGGAGGAAGGTGGGTGCGAGCTG (SEQ ID
 NO. 141)

AK 4-1BB (внутриклеточный домен)

KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID
 NO. 142)

AK OX40

RRDQRLPPDANKPPGGGSFRTPIQEEQADANSTLAKI (SEQ ID NO.
 143)

AK лидерной последовательности

MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 144)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Химерный антигенный рецептор, который связывается с лектиноподобным белком-1 С-типа ("CLL-1"), где указанный химерный антигенный рецептор представляет собой полипептид, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент Fv (scFv), который связывает CLL-1, трансмембранный домен, внеклеточный домен и внутриклеточный активирующий домен, который представляет собой активирующий домен из CD3 дзета, и где scFv содержит пару вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL), которая выбрана из группы, состоящей из

(a) области VH, содержащей определяющие комплементарность участки ("CDR") 1, 2 и 3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 19 соответственно, и области VL, содержащей CDR 1, 2 и 3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24 соответственно; и

(b) области VH, содержащей CDR 1, 2 и 3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 и SEQ ID NO: 53 соответственно, и области VL, содержащей CDR 1, 2 и 3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57 и SEQ ID NO: 58 соответственно.

2. Химерный антигенный рецептор по п.1, отличающийся тем, что активирующий домен CD3 дзета содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

3. Химерный антигенный рецептор по п.1, дополнительно включающий по меньшей мере один сигнальный участок костимулирующего домена.

4. Химерный антигенный рецептор по п.3, отличающийся тем, что сигнальный участок костимулирующего домена представляет собой сигнальный участок CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD27 или ICOS.

5. Химерный антигенный рецептор по п.4, отличающийся тем, что сигнальный участок костимулирующего домена содержит SEQ ID NO: 8.

6. Химерный антигенный рецептор по п.5, отличающийся тем, что указанный химерный антигенный рецептор содержит SEQ ID NO: 2.

7. Химерный антигенный рецептор по п.1, отличающийся тем, что указанный трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD28 или CD8.

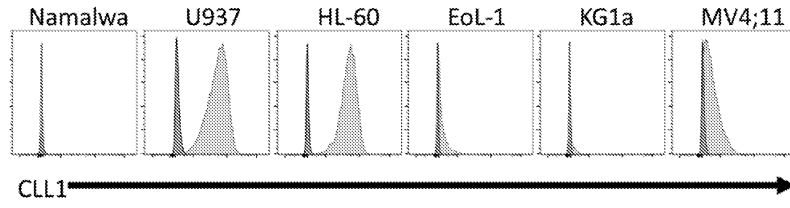
8. Химерный антигенный рецептор по п.7, отличающийся тем, что трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD28, который содержит SEQ ID NO: 6.

9. Химерный антигенный рецептор по п.1, отличающийся тем, что указанный химерный антигенный рецептор содержит

(a) внеклеточный и трансмембранный домен CD28, указанные в SEQ ID NO: 2; или

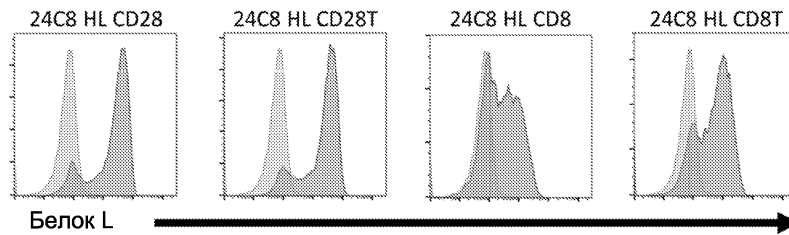
- (b) внеклеточный и трансмембранный домен CD8, указанные в SEQ ID NO: 14.
10. Химерный антигенный рецептор по п.1, отличающийся тем, что линкер scFv содержит по меньшей мере одну из SEQ ID NO: 130 или SEQ ID NO: 132.
11. Химерный антигенный рецептор по п.1, отличающийся тем, что scFv содержит
- (a) область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; или
- (b) область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55.
12. Химерный антигенный рецептор, который связывается с лектиноподобным белком 1 С-типа ("CLL-1"), где указанный химерный антигенный рецептор представляет собой полипептид, содержащий одноцепочечный переменный фрагмент Fv ("scFv"), который связывает CLL-1, трансмембранный домен и внутриклеточный активирующий домен, который представляет собой активирующий домен из CD3 дзета, и где scFv содержит пару переменной области тяжелой цепи (VH) и переменной области легкой цепи (VL), которая выбрана из группы, состоящей из
- (a) области VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и области VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; и
- (b) области VH, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, и области VL, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55.
13. Выделенный полинуклеотид, кодирующий химерный антигенный рецептор по любому из пп.1-12.
14. Вектор для экспрессии химерного антигенного рецептора по любому из пп.1-12 в клетке, содержащий полинуклеотид по п.13.
15. Вектор по п.14, который представляет собой ретровирусный вектор, ДНК-вектор, плазмиду, РНК-вектор, вектор на основе аденовируса, вектор на основе аденоассоциированного вируса или лентивирусный вектор.
16. Клетка иммунной системы для экспрессии химерного антигенного рецептора по любому из пп.1-12, содержащая вектор по п.14, причем указанная клетка иммунной системы представляет собой Т-клетку.
17. Клетка иммунной системы по п.16, отличающаяся тем, что указанная клетка представляет собой аутологичную Т-клетку.
18. Клетка иммунной системы по п.16, отличающаяся тем, что указанная клетка представляет собой аллогенную Т-клетку.
19. Фармацевтическая композиция, содержащая Т-клетку по п.17 или 18 и фармацевтически приемлемый носитель для лечения заболевания или расстройства, связанного с CLL-1.
20. Полипептид химерного антигенного рецептора, который связывается с лектиноподобным белком 1 С-типа ("CLL-1"), по п.1, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 48.
21. Выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид химерного антигенного рецептора по п.1, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 47.
22. Вектор для экспрессии полипептида по п.20 в клетке, содержащий полинуклеотид по п.21.
23. Вектор по п.22, который представляет собой ретровирусный вектор, ДНК-вектор, плазмиду, РНК-вектор, вектор на основе аденовируса, вектор на основе аденоассоциированного вируса или лентивирусный вектор.
24. Клетка иммунной системы для экспрессии полипептида по п.20, содержащая вектор по п.22, причем указанная клетка иммунной системы представляет собой Т-клетку.
25. Клетка иммунной системы по п.24, отличающаяся тем, что указанная клетка представляет собой аутологичную Т-клетку.
26. Клетка иммунной системы по п.24, отличающаяся тем, что указанная клетка представляет собой аллогенную Т-клетку.
27. Фармацевтическая композиция, содержащая Т-клетку по любому из пп.24-26 и фармацевтически приемлемый носитель для лечения заболевания или расстройства, связанного с CLL-1.
28. Способ лечения опухоли или злокачественного новообразования, которые экспрессируют лектиноподобный белок 1 С-типа ("CLL-1"), причем указанный способ включает введение фармацевтической композиции по п.27 человеку с опухолью или злокачественным новообразованием, которые экспрессируют CLL-1.

Экспрессия CLL-1 в различных линиях раковых клеток



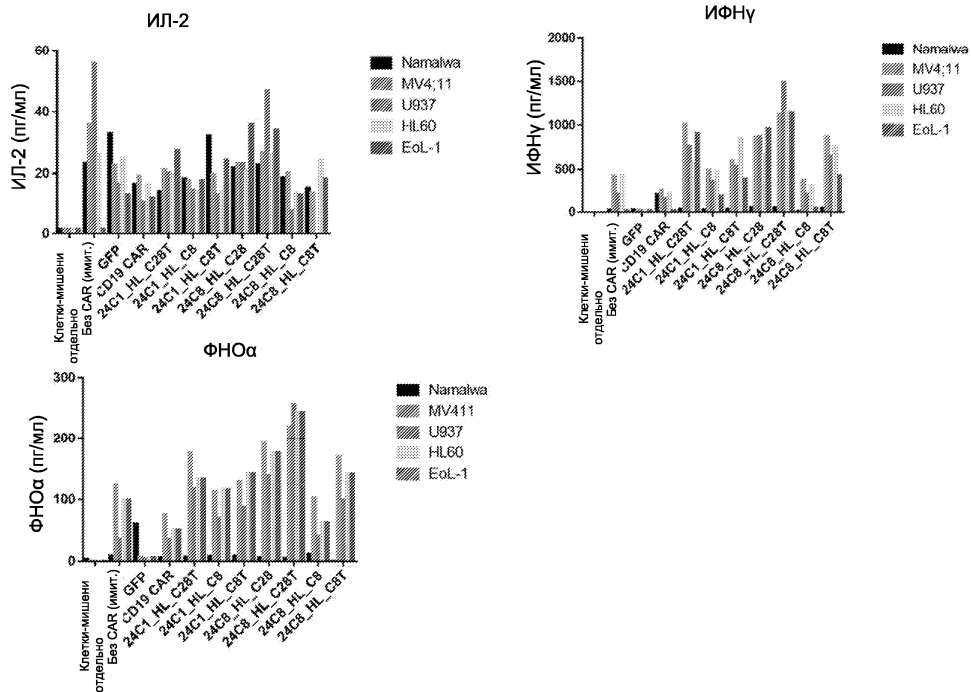
Фиг. 1

Экспрессия CAR против CLL-1, определяемая по белку L, через 6 ч после электропорации мРНК



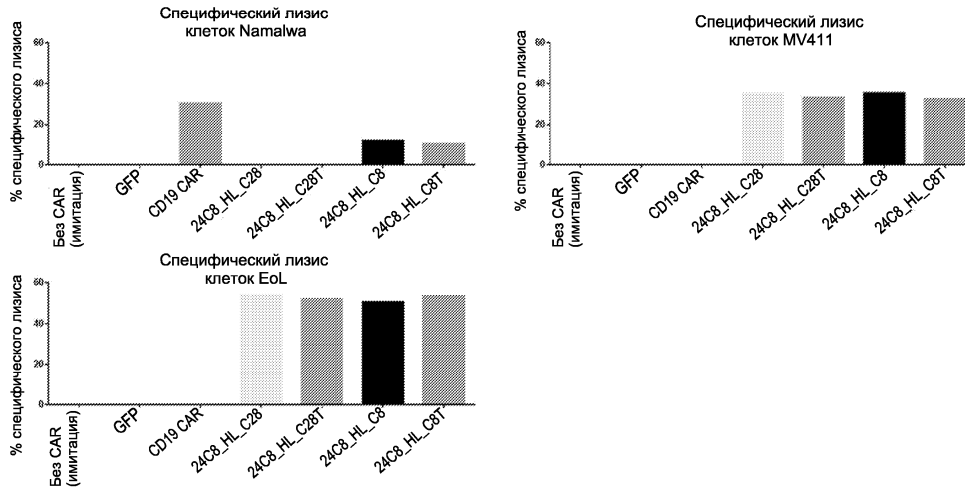
Фиг. 2

Анализ высвобождения цитокинов из различных сконструированных Т-клеток, экспрессирующих CAR против CLL-1, через 24 ч после электропорации мРНК



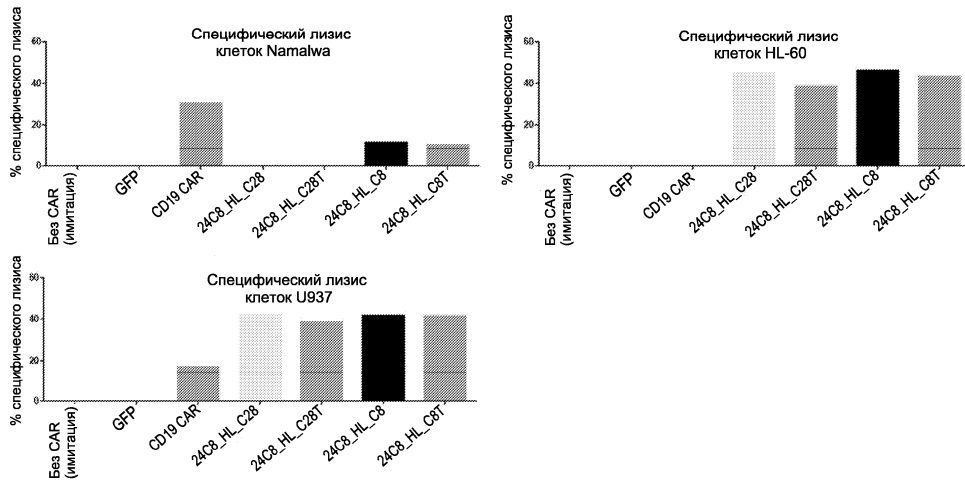
Фиг. 3

Анализ высвобождения цитокинов из различных сконструированных Т-клеток, экспрессирующих CAR против CLL-1, через 24 ч после электропорации мРНК



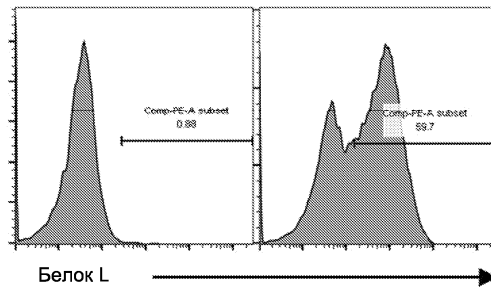
Фиг. 4

Цитолитическая активность различных сконструированных Т-клеток, экспрессирующих CAR против CLL-1, через 24 ч после электропорации мРНК



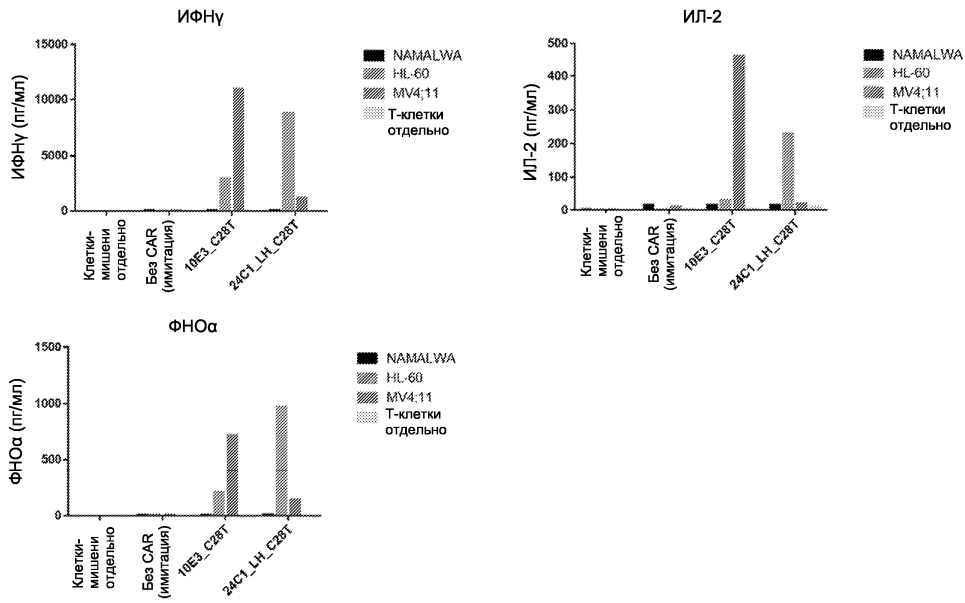
Фиг. 5

Экспрессия CLL-1, определяемая по белку L, на 12 день после трансдукции



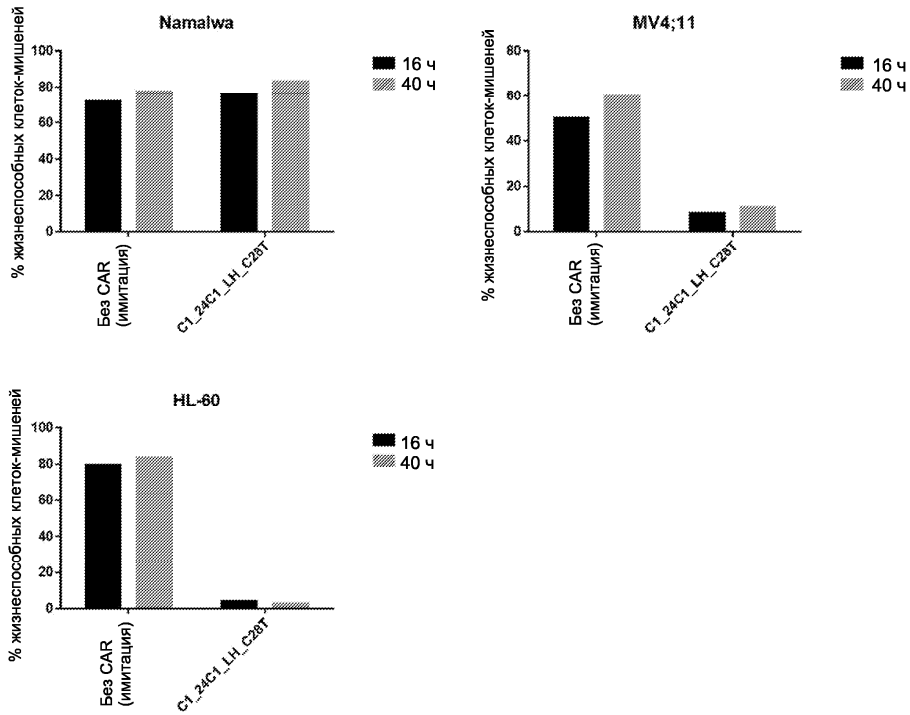
Фиг. 6

Анализ высвобождения цитокинов из Т-клеток, экспрессирующих CAR против CLL-1, после совместного культивирования в течение 16 ч с различными линиями клеток-мишеней



Фиг. 7

Цитолитическая активность Т-клеток, экспрессирующих CAR против CLL-1, после совместного культивирования в течение 16 ч и 40 ч с различными линиями клеток-мишеней



Фиг. 8

Связывающие молекулы против CLL-1

	FR1	CDR1	FR2	CDR2
24C1_VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLICTVSS	GGSISS--YIWSWIRQFPKGLLEWIGYI	YHSGS-T	
24C8_VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLICTVSS	GGSISSGGIYWSWIRQHPKGLLEWIGYI	HNSGS-T	
20C5.1_VH	QVQLVQSQAENVKRPASVVKVSKVSS	GYTLT--ELSMHWVRQAPKGLLEWVGGE	DFEDGET	
20C5.2_VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	SFTFSS--YGMHWVRQAPKGLLEWVAIVS	YDSSSEK	
	****	::* : :*	::* : :*	::* : :*

	FR3	CDR3	FR4
24C1_VH	NYNPSLKSRVTISVDTSKNQESLKLSSVTAADTAVYYCVS	LVYCGGDCYSGFDM	WGQGTLL
24C8_VH	HYNPSLKSRVTISIDTSKNLESRLSSVTAADTAVYYCAS	LVYCGGDCYSGFDM	WGQGTLL
20C5.1_VH	IYAQKFKQGRVTVTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATE	SRGIG--WPFYDM	WGQGTLL
20C5.2_VH	YYVDSVKGRFTISRDNKSNRLYLQMNLSLRADTAVYYCAR	ERYSG-----	RDYWGQGTLL
	*	::* : :*	::* : :*

	FR4
24C1_VH	VTVSS
24C8_VH	VTVSS
20C5.1_VH	VTVSS
20C5.2_VH	VTVSS

Фиг. 9A

	SEQ ID NO:			
	VH	CDR1	CDR2	CDR3
24C1_VH	16	17	18	19
24C8_VH	50	51	52	53
20C5.1_VH	72	73	74	75
20C5.2_VH	94	95	96	97

Фиг. 9B

Связывающие молекулы против CLL-1

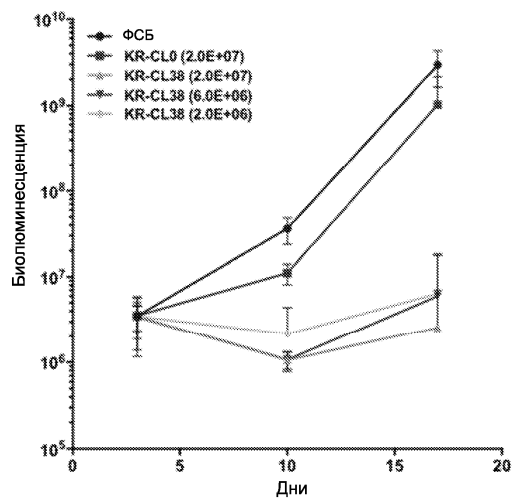
	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3
24C1_VL	DIQLTQSPSSLSASVGDVRSFTCS	QASQDINNFLN	WYQQKPKGKAPKLLI	YDASNLET	VVPS
24C8_VL	DIQLTQSPSSLSASVGDVRSFTCS	QASQDINNFLN	WYQQKPKGKAPKLLI	YDASNLET	VVPS
20C5.1_VL	DIQMTQSPSSLSASVGDVRSFTCS	QASQSLSSYLN	WYQQKPKGKAPKLLI	SGASSLKS	VVPS
20C5.2_VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCR	ASQSVSLLT	WYQQKPKGQAPRLLI	ESASTRA	TEIPA
	*	::* : :*	::* : :*	::* : :*	::* : :*

	FR3	CDR3	FR4
24C1_VL	RFSGSGSGTDFTFTLISLQPEDIATYYC	QQYGNLPFT	FGGGTKVEIKR
24C8_VL	RFSGSGSGTDFTFTLISLQPEDIATYYC	QQYGNLPFT	FGGGTKVEIKR
20C5.1_VL	RFSGSGSGTDFTLTISSLPPEDEATYYC	QQSYSTPIT	FGQGTTRLEIKR
20C5.2_VL	RFSGSGSGTGFITLTISSLQSEDEAVYYC	QQYDTWPF	FGPGTKVDFKR
	*****	::* : :*	::* : :*

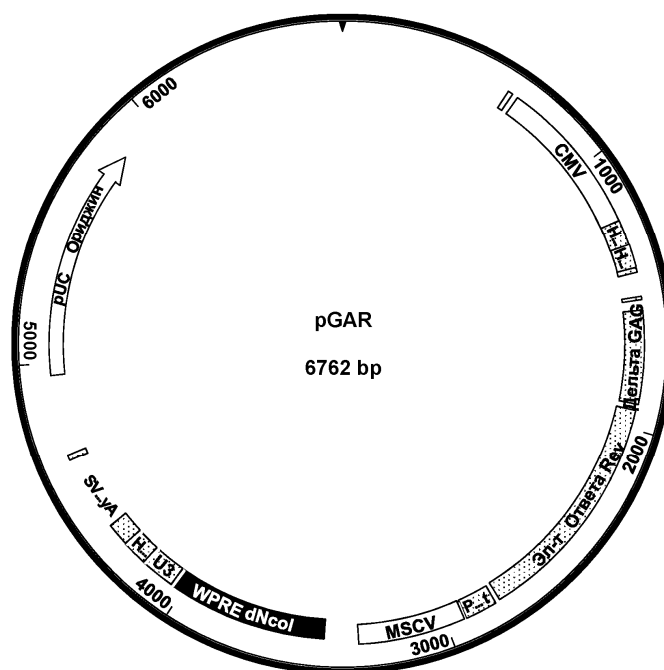
Фиг. 9C

	SEQ ID NO:			
	VL	CDR1	CDR2	CDR3
24C1_VL	21	22	23	24
24C8_VL	55	56	57	58
20C5.1_VL	77	78	79	80
20C5.2_VL	99	100	101	102

Фиг. 9D



Фиг. 10



Фиг. 11