(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202192188 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.02.18

(22) Дата подачи заявки
2020.03.06

(51) Int. Cl. *C12N 9/88* (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ CA2 И СПОСОБЫ НАСТРАИВАЕМОГО РЕГУЛИРОВАНИЯ

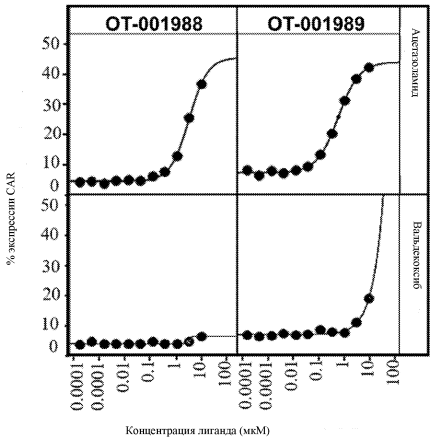
(31) **62/815,399; 62/815,402; 62/826,487; 62/826,443; 62/835,552; 62/835,548; 62/860,388**
(32) **2019.03.08; 2019.03.08; 2019.03.29; 2019.03.29; 2019.04.18; 2019.04.18; 2019.06.12**
(33) **US**
(86) **PCT/US2020/021596**
(87) **WO 2020/185632 2020.09.17**

(71) Заявитель:
ОБСИДИАН ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Сури Випин, Ричардсон Селеста, Долински Брайан, Кулкарни Абнишек, Иннисс Мара Кристин, Сун Дексью, Вайсман Элизабет Джейн, Олингер Грейс Ю., Хеллер Скотт Фрэнсис, Гори Дженнифер Ли, Олс Мишель Линн, Элпек Кутлу Гоксу, Эзелл Такер, Шебеста Майкл, Флери Майкл Луис, Сетхи Дхрув Кам (US)

(74) Представитель:
Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М., Строкова О.В., Гизатуллина Е.М., Джермакян Р.В. (RU)

(57) В изобретении предложены регулируемые системы биоциклов. Такие системы обеспечивают модульные и настраиваемые системы экспрессии белка для обеспечения открытия и разработки терапевтических методов. В частности, настоящее изобретение направлено на слитые белки, содержащие фрагмент карбоангидразы 2 человека и химерного антигенного рецептора (CAR). Активность дестабилизирующего домена может регулироваться агентами, вводимыми извне.



202192188 A1

202192188 A1

КОМПОЗИЦИИ CA2 И СПОСОБЫ НАСТРАИВАЕМОГО РЕГУЛИРОВАНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США № 62/815399, поданной 8 марта 2019 года; предварительной заявки США № 62/815402, поданной 8 марта 2019 года; предварительной заявки США № 62/826487, поданной 29 марта 2019 года; предварительной заявки США № 62/826443, поданной 29 марта 2019 года; предварительной заявки США № 62/835548, поданной 18 апреля 2019 года; предварительной заявки США № 62/835552, поданной 18 апреля 2019 года и предварительной заявки США № 62/860388, поданной 12 июня 2019 года. Полное содержание вышеупомянутых заявок включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Настоящая заявка содержит «длинный» перечень последовательностей, который был подан на CD-R вместо печатной бумажной копии и включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Указанные CD-R, созданные и записанные 6 марта 2020 года, имеют обозначения «CRF», «Копия 1», «Копия 2», «Копия 3» и «Копия 4» соответственно, и каждый содержит только один и тот же файл размером 699270904 байт (измеренный в MS-WINDOWS) с названием 268052-462540_SL.txt. Машиночитаемый формат каждого CD-R представляет собой IBM-PC, а операционная система для каждого CD-R представляет собой MS-Windows.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Настоящее изобретение относится к дестабилизирующим доменам (ДД), полученным из карбоангидразы 2 (CA2) человека, которые могут настраивать стабильность белка по меньшей мере для одной полезной нагрузки, а также к композициям и способам их применения. В настоящем изобретении предложены полипептиды системы биоциклов CA2, эффекторные модули CA2, элементы ответа на стимул (SRE, англ.: stimulus response elements), кодирующие их полинуклеотиды, векторы и клетки, содержащие полипептиды и/или полинуклеотиды для применения в иммунотерапии рака.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Генная и клеточная терапии производят революцию в медицине и открывают новые перспективы для лечения ранее трудноизлечимых заболеваний. Однако большинство современных технологий не позволяют титровать время или уровень индукции целевого белка. Это сделало многие потенциальные применения генной и клеточной терапии трудными или невозможными для безопасного и эффективного применения.

[0005] Неадекватный контроль экзогенных и/или эндогенных генов является критической проблемой во многих случаях генной и клеточной терапии. Отсутствие возможности настройки также затрудняет безопасную экспрессию белков с узким или неопределенным терапевтическим окном или тех, которые требуют более титруемой или переходной экспрессии.

[0006] Одним из подходов к регулированию экспрессии или функции белка является использование дестабилизирующих доменов (ДД). Дестабилизирующие домены представляют собой небольшие белковые домены, которые могут быть присоединены к представляющему интерес белку-мишени. ДД делают присоединенный представляющий интерес белок нестабильным в отсутствие ДД-связывающего лиганда, и представляющий интерес белок быстро разрушается убиквитин-протеасомной системой клетки. Однако,

когда специфический низкомолекулярный ДД-связывающий лиганд связывается с ДД, представляющий интерес белок стабилизируется, и функция белка реализуется.

[0007] Технология ДД формирует основу нового класса клеточных и генных терапий, которые могут обеспечить настраиваемый и временной контроль экспрессии и функции генов, расширяя спектр белковых терапий, которые могут быть безопасно и эффективно включены в методы клеточной и генной терапии.

Сущность изобретения

[0008] В настоящем изобретении предложены новые белковые домены, полученные из карбоангидразы 2 (CA2) человека, демонстрирующие низкомолекулярно-зависимую стабильность. Такие белковые домены называются дестабилизирующими доменами (ДД). В отсутствие связывающего лиганда ДД дестабилизируется и вызывает деградацию полезной нагрузки, соединенной с ДД (например, представляющего интерес белка (POI, англ.: protein of interest), в то время как в присутствии связывающего лиганда слитые ДД и полезная нагрузка могут быть стабилизированы, а их стабильность является дозозависимой.

[0009] В первом аспекте в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая эффекторный модуль. Эффекторный модуль содержит элемент ответа на стимул (SRE) и по меньшей мере одну полезную нагрузку, которая функционально связана с SRE. В различных вариантах осуществления SRE содержит дестабилизирующий домен (ДД), при этом ДД содержит целую карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717) или ее область, и дополнительно содержит мутацию H122Y в аминокислоте в положении 122 (H122) SEQ ID NO: 11717.

[0010] Во втором аспекте в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая эффекторный модуль. Эффекторный модуль содержит элемент ответа на стимул (SRE) и по меньшей мере одну полезную нагрузку, которая функционально связана с SRE. В различных вариантах осуществления SRE содержит дестабилизирующий домен (ДД), при этом ДД содержит целую карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717) или ее область, и дополнительно содержит мутацию E106D в аминокислоте в положении 106 (E106) SEQ ID NO: 11717.

[0011] В третьем аспекте в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая эффекторный модуль. Эффекторный модуль содержит элемент ответа на стимул (SRE) и по меньшей мере одну полезную нагрузку, которая функционально связана с SRE. В различных вариантах осуществления SRE содержит дестабилизирующий домен (ДД), при этом ДД содержит целую карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717) или ее область, и дополнительно содержит мутацию W208S в аминокислоте в положении 208 (W208) SEQ ID NO: 11717.

[0012] В четвертом аспекте в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая эффекторный модуль. Эффекторный модуль содержит элемент ответа на стимул (SRE) и по меньшей мере одну полезную нагрузку, которая функционально связана с SRE. В различных вариантах осуществления SRE содержит дестабилизирующий домен (ДД), при этом ДД содержит целую карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717) или ее область, и дополнительно содержит мутацию I59N в аминокислоте в положении 59 (I59) SEQ ID NO: 11717.

[0013] В пятом аспекте в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая эффекторный модуль. Эффекторный модуль содержит элемент ответа на стимул (SRE) и по меньшей мере одну полезную нагрузку, которая функционально связана с SRE. В различных вариантах осуществления SRE содержит дестабилизирующий домен (ДД), при этом ДД содержит целую карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717) или ее область, и дополнительно содержит мутацию L156H в аминокислоте в положении 156 (L156) SEQ ID NO: 11717. В сходных вариантах осуществления пятого аспекта, ДД дополнительно содержит: (i) мутацию W4Y в аминокислоте в положении 4 (W4) SEQ ID NO: 11717; (ii) мутацию F225L в аминокислоте в положении 225 (F225) SEQ ID NO: 11717; (iii) делецию аминокислот в положениях 257-260 SEQ ID NO: 11717; (iv) делецию аминокислот в положениях 1-5 SEQ ID NO: 11717; или (v) делецию аминокислот G234, E235 и P236 SEQ ID NO: 11717; или ДД содержит четыре мутации по сравнению с SEQ ID NO: 11717, включая мутации, соответствующие: (i) L156H, S172C, F178Y и E186D; или (ii) D70N, D74N, D100N и L156H.

[0014] В шестом аспекте в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая эффекторный модуль. Эффекторный модуль содержит элемент ответа на стимул (SRE) и по меньшей мере одну полезную нагрузку, которая функционально связана с SRE. В различных вариантах осуществления SRE содержит дестабилизирующий домен (ДД), содержащий целую карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717) или ее область, и дополнительно содержит первую мутацию и вторую мутацию по сравнению с SEQ ID NO: 11717, при этом: (i) первая мутация представляет собой мутацию S73N в аминокислоте в положении 73 (S73) SEQ ID NO: 11717; и (ii) вторая мутация представляет собой замену F или Y в аминокислотном положении 89 (R89) SEQ ID NO: 11717.

[0015] В седьмом аспекте предложена композиция, содержащая эффекторный модуль. Эффекторный модуль содержит элемент ответа на стимул (SRE) и по меньшей мере одну полезную нагрузку, которая функционально связана с SRE. В различных вариантах осуществления SRE содержит дестабилизирующий домен (ДД), содержащий целую карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717) или ее область, и дополнительно содержит замену N или F в аминокислотном положении 56 (S56) SEQ ID NO: 11717.

[0016] В восьмом аспекте предложена композиция, содержащая эффекторный модуль. Эффекторный модуль содержит элемент ответа на стимул (SRE) и по меньшей мере одну полезную нагрузку, которая функционально связана с SRE. В различных вариантах осуществления SRE содержит дестабилизирующий домен (ДД), содержащий целую карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717), и дополнительно содержит одну или более замен по сравнению с SEQ ID NO: 11717, при этом по меньшей мере одна замена представляет собой замену D или N в аминокислотном положении 63 (G63) SEQ ID NO: 11717, и при этом одна или более замен соответствуют: G63D; G63D и M240L; G63D, E69V и N231I; или T55K, G63N и Q248N.

[0017] В девятом аспекте предложена композиция, содержащая эффекторный модуль. Эффекторный модуль содержит элемент ответа на стимул (SRE) и по меньшей мере одну полезную нагрузку, которая функционально связана с SRE. В различных вариантах осуществления SRE содержит дестабилизирующий домен (ДД), содержащий целую карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717) или ее область, и дополнительно содержит две или более замен по сравнению с SEQ ID NO: 11717, при этом одна из двух или более замен представляет собой замену L или K в аминокислотном положении 71 (D71) SEQ ID NO: 11717. В различных вариантах осуществления две или более замен соответствуют: D71L и T87N; D71L и L250R; D71L, T87N и L250R; или D71K и T192F.

[0018] В десятом аспекте предложена композиция, содержащая эффекторный модуль. Эффекторный модуль содержит элемент ответа на стимул (SRE) и по меньшей мере одну полезную нагрузку, которая функционально связана с SRE. В различных вариантах осуществления SRE содержит дестабилизирующий домен (ДД), содержащий целую карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717) или ее область, и дополнительно содержит две или более замен по сравнению с SEQ ID NO: 11717. По меньшей мере одна из двух или более замен представляет собой: (i) замену F в аминокислотном положении 241 (V241) SEQ ID NO: 11717; или (ii) замену F или L в аминокислотном положении 249 (P249) SEQ ID NO: 11717; и при этом две или более замен соответствуют: D72F и V241F; D72F и P249L; D72F и P249F; D72F, V241F и P249L; A77I и P249F; или V241F и P249L.

[0019] В одиннадцатом аспекте в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая эффекторный модуль. Эффекторный модуль содержит элемент ответа на стимул (SRE) и по меньшей мере одну полезную нагрузку, которая функционально связана с SRE. SRE содержит дестабилизирующий домен (ДД), содержащий целую карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717), и дополнительно содержит одну или более замен по сравнению с SEQ ID NO: 11717, выбранных из Y51T, L183S, Y193I, L197P и комбинации V134F и L228F.

[0020] В сходных вариантах осуществления всех приведенных выше аспектов, SRE отвечает на один или более стимулов. В различных вариантах осуществления стимул представляет собой низкомолекулярное соединение, выбранное из ацетазоламида, целекоксиба, вальдекоксиба, рофекоксиба, метазоламида, дорзоламида, бринзоламида, диклофенамида, этоксзоламида, зонисамида, дансиламида или дихлорфенамида. Кроме того, описанные и приведенные в качестве примера композиции содержат ДД, имеющий по меньшей мере одну мутацию или замену в ДД, которая дестабилизирует ДД и по меньшей мере одну полезную нагрузку в отсутствие стимула, и при этом ДД и полезная нагрузка стабилизируются в присутствии стимула.

[0021] В двенадцатом аспекте в настоящем изобретении предложены: система биоцикла, включающая любую одну или более композиций, описанных в аспектах 1-10; фармацевтическая композиция, включающая композицию, описанную в аспектах 1-10, и фармацевтически приемлемый эксципиент; полинуклеотид, кодирующий композицию, описанную в аспектах 1-10; вектор, включающий полинуклеотид, который кодирует композицию, описанную в аспектах 1-10; клетка, включающая полинуклеотид, который кодирует композицию, описанную в аспектах 1-10; фармацевтическая композиция, включающая клетку, которая включает полинуклеотид, кодирующий композицию, описанную в аспектах 1-10, и фармацевтически приемлемый эксципиент.

[0022] В тринадцатом аспекте в настоящем изобретении предложен способ лечения заболевания у субъекта, нуждающегося в этом. Способ включает: (a) введение субъекту терапевтически эффективного количества клетки по аспекту 11, при этом клетка содержит полезную нагрузку, которая лечит заболевание; и (b) введение субъекту терапевтически эффективного количества стимула, при этом SRE отвечает на стимул и экспрессия полезной нагрузки модулируется в ответ на стимул для лечения таким образом заболевания.

[0023] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен элемент ответа на стимул (SRE), который может содержать дестабилизирующий домен (ДД), полученный из карбоангидразы 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717) полностью или частично. В одном варианте осуществления ДД может включать целую CA2 (SEQ ID NO: 11717).

[0024] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен ДД, содержащий целую карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717) или ее область, и дополнительно содержащий мутацию по сравнению с SEQ ID NO: 11717, выбранную из A115L, A116Q, A116V, A133L, A133T, A141P, A152D, A152L, A152R, A173C, A173G, A173L, A173T, A23P, A247L, A247S, A257L, A257S, A38P, A38V, A54Q, A54V, A54X, A65L, A65N, A65V, A77I, A77P, A77Q, C205M, C205R, C205V, C205W, C205Y, D101G, D101M, D110I, D129I, D138G, D138M, D138N, D161*, D161M, D161V, D164G, D164I, D174*, D174T, D179E, D179I, D179R, D189G, D189I, D19T, D19V, D242G, D242T, D32T, D34T, D41T, D52I, D52L, D71F, D71G, D71K, D71M, D71S, D71Y, D72I, D72S, D72T, D72X, D75T, D75V, D85M, E106D, E106G, E106S, E117*, E117N, E14N, E186*, E186N, E204A, E204D, E204G, E204N, E213*, E213G, E213N, E220K, E220R, E220S, E233D, E233G, E233R, E235*, E235G, E235N, E237K, E237R, E238*, E238N, E238R, E26S, E69D, E69K, E69S, F130L, F146V, F175I, F175L, F175S, F178L, F178S, F20L, F20S, F225I, F225L, F225S, F225Y, F230I, F230L, F230S, F259L, F259S, F66S, F70I, F70L, F95Y, G102D, G104R, G104V, G128R, G12D, G12E, G131E, G131R, G131W, G139D, G144D, G144V, G150A, G150S, G150W, G155A, G155C, G155D, G155S, G170A, G170D, G182A, G182W, G195A, G195R, G232R, G232W, G234L, G234V, G25E, G63D, G63V, G81E, G81V, G82D, G86A, G86D, G98V, H107I, H107Q, H119T, H119Y, H122T, H122Y, H15L, H15T, H15Y, H17D, H17I, H36I, H36Q, H64M, H94T, H96T, I145F, I145M, I166H, I166L, I209D, I209L, I215H, I215S, I22L, I255N, I255S, I33S, I59F, I59N, I59S, I91F, K111E, K111N, K112R, K113I, K113N, K126N, K132E, K132R, K148E, K148R, K153*, K153N, K158E, K158N, K167*, K169N, K169R, K171Q, K171R, K18R, K212N, K212Q, K212R, K212W, K224E, K224N, K227*, K227N, K24R, K251E, K251R, K256Q, K260F, K260L, K260Q, K39S, K45N, K45S, K80M, K80R, L118F, L120W, L140V, L140W, L143*, L147*, L147F, L156F, L156H, L156P, L156Q, L163A, L163W, L183P, L183S, L184F, L184P, L188P, L188W, L197*, L197M, L197P, L197R, L197T, L202F, L202H, L202I, L202P, L202R, L202S, L203P, L203S, L203W, L211*, L211A, L211S, L223*, L223I, L223V, L228F, L228H, L228T, L239*, L239F, L239T, L250*, L250P, L250T, L44*, L44M, L47C, L47V, L57*, L57X, L60S, L79F, L79S, L84W, L90*, L90V, M240D, M240L, M240R, M240W, N11D, N11K, N124T, N177*, N177T, N229*, N229T, N231D, N231F, N231K, N231L, N231M, N231Q, N231T, N243Q, N243T, N252E, N252T, N61R, N61T, N61Y, N62K, N62M, N67D, N67T, P137L, P13A, P13H, P13L, P13S, P154L, P154R, P154T, P180L, P180S, P185L, P185S, P185V, P194Q, P200A, P200L, P200S, P200T, P201A, P201L, P201R, P201S, P214T, P236L, P236T, P246L, P246Q, P249A, P249F, P249H, P249I, P249X, P30L, P30S, P42L, P83A, Q103K, Q135S, Q136N, Q157R, Q157S, Q221A, Q221R, Q248F, Q248L, Q248S, Q254A, Q254K, Q28S, Q53H, Q53K, Q53N, Q74R, Q92H, Q92S, R181H, R181S, R181V, R226H, R226P, R226V, R245A, R253G, R253Q, R27A, R58G, R89D, R89F, R89I, R89X, R89Y, S105L, S105Q, S151A, S151I, S151Q, S165F, S165P, S172E, S172V, S187I, S187P, S196H, S196L, S216A, S216Q, S218A, S218Q, S219A, S219Q, S258F, S258P, S29C, S29P, S43P, S43T, S48L, S50P, S56F, S56N, S56P, S56X, S73L, S73N, S73X, S99H, T108L, T125I, T125P, T168K, T168N, T168Q, T176H, T176L, T192D, T192F, T192I, T192N, T192P, T192X, T198D, T198I, T198P, T199A, T199H, T199P, T207D, T207I, T207P, T207S, T35I, T35L, T37Q, T55L, T87L, V109M, V109W, V121F, V134C, V134F, V142F, V149G, V149L, V159L, V159S, V160C, V160L, V162A, V162C, V206*, V206C, V206M, V210C, V217L, V217R, V217S, V222A, V222C, V222G, V241G, V241W, V241X, V31L, V49F, V68L, V68W, V78C, W123G, W123R, W16G, W191*, W191G, W191L, W208G, W208L, W208S, W244*, W244G, W244L, W97C, W97G, Y114H, Y114M, Y127M, Y190*, Y190L, Y190T, Y193C, Y193F, Y193I, Y193L, Y193T, Y193V, Y193X, Y40M, Y51F, Y51M, Y51T, Y51X, Y88T, K9N и S29A.

[0025] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен ДД, содержащий целую карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717) или ее область, и дополнительно содержащий мутацию по сравнению с SEQ ID NO: 11717, выбранную из E106D, G63D, H122Y, I59N, L156H, L183S, L197P, S56F, S56N, W208S, Y193I и Y51T.

[0026] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен ДД, содержащий целую карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717) или ее область, и дополнительно содержащий две или более мутаций по сравнению с SEQ ID NO: 11717. В некоторых вариантах осуществления, ДД может содержать CA2 (ак 2-260 ДТ, R27L, H122Y), CA2 (ак 2-260 ДТ, T87I, H122Y), CA2 (ак 2-260 ДТ, H122Y, N252D), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, V241F), CA2 (ак 2-260 ДТ, V241F, P249L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71L, L250R), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249F), CA2 (ак 2-260 ДТ, T55K, G63N, Q248N), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, A257del, S258del, F259del, K260del), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, S2del, H3del, H4del, W5del), CA2 (ак 2-260 ДТ, W4Y, L156H), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, G234del, E235del, P236del), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, F225L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D70N, D74N, D100N, L156H), (CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, G102R)(SEQ ID NO: 210598), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, E69V, N231I)(SEQ ID NO. 210748), CA2 (ак 2-260 ДТ, R27L, T87I, H122Y, N252D)(SEQ ID NO. 210702), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, V241F, P249L)(SEQ ID NO. 210503), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71L, T87N, L250R)(SEQ ID NO. 210510), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, S172C, F178Y, E186D)(SEQ ID NO. 210756), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71F, N231F)(SEQ ID NO. 210505), CA2 (ак 2-260 ДТ, A77I, P249F)(SEQ ID NO. 210514), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, P249H)(SEQ ID NO. 210516), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249H)(SEQ ID NO. 210518), CA2 (ак 2-260 ДТ, Q53N, N61Y)(SEQ ID NO. 210521), CA2 (ак 2-260 ДТ, E106D, C205S)(SEQ ID NO. 210523), CA2 (ак 2-260 ДТ, C205S, W208S)(SEQ ID NO. 210525), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73N, R89Y)(SEQ ID NO. 210532), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, T192F)(SEQ ID NO. 210534), CA2 (ак 2-260 ДТ, Y193L, K260L)(SEQ ID NO. 210540), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71F, V241F, P249L)(SEQ ID NO. 210544), CA2 (ак 2-260 ДТ, L147F, Q248F)(SEQ ID NO. 210548), CA2 (ак 2-260 ДТ, D52I, S258P)(SEQ ID NO. 210550), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72S, T192N)(SEQ ID NO. 210552), CA2 (ак 2-260 ДТ, D179E, T192I)(SEQ ID NO. 210554), CA2 (ак 2-260 ДТ, S56N, Q103K)(SEQ ID NO. 210558), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71Y, Q248L)(SEQ ID NO. 210560), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73N, R89F)(SEQ ID NO. 210562), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, N231L, E235G, L239F)(SEQ ID NO. 210564), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249I)(SEQ ID NO. 210568), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72X, V241X, P249X)(SEQ ID NO. 210572), CA2 (ак 2-260 ДТ, A54X, S56X, L57X, T192X)(SEQ ID NO. 210574), CA2 (ак 2-260 ДТ, Y193V, K260F)(SEQ ID NO. 210576), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, M240L)(SEQ ID NO. 210578), CA2 (ак 2-260 ДТ, V134F, L228F)(SEQ ID NO. 210580), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71G, N231K)(SEQ ID NO. 210582), CA2 (ак 2-260 ДТ, S56F, D71S)(SEQ ID NO. 210584), CA2 (ак 2-260 ДТ, D52L, G128R, Q248F)(SEQ ID NO. 210586), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73X, R89X)(SEQ ID NO. 210588), CA2 (ак 2-260 ДТ, Y51X, D72X, V241X, P249X)(SEQ ID NO. 210592), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72I, W97C)(SEQ ID NO. 210594), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, T192F, N231F)(SEQ ID NO. 210596), CA2 (ак 2-260 ДТ, H36Q, S43T, Y51F, N67D, G131W, R226H)(SEQ ID NO. 210698), CA2 (ак 2-260 ДТ, F70I, F146V)(SEQ ID NO. 210700), CA2 (ак 2-260 ДТ, K45N, V68L, H119Y, K169R, D179E)(SEQ ID NO. 210704), CA2 (ак 2-260 ДТ, H15L, A54V, K111E, E220K, F225I)(SEQ ID NO. 210706), CA2 (ак 2-260 ДТ, P13S, P83A, D101G, K111N, F230I)(SEQ ID NO. 210708), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, W123R, E220K)(SEQ ID NO. 210712), CA2 (ак 2-260 ДТ, N11D, E69K, G86D, V109M, K113I, T125I, D138G, G155S)(SEQ ID NO. 210714), CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, G102R, A173T)(SEQ ID NO. 210716), CA2 (ак 2-260 ДТ, L79F, P180S)(SEQ ID NO. 210718), CA2 (ак 2-260 ДТ, A77P, G102R, D138N)(SEQ ID NO. 210724), CA2 (ак 2-260 ДТ, F20L, K45N, G63D, E69V,

N231I)(SEQ ID NO. 210726), CA2 (ак 2-260 ДТ, T199N, L202P, L228F)(SEQ ID NO. 210728), CA2 (ак 2-260 ДТ, K9N, H122Y, T168K)(SEQ ID NO. 210730), CA2 (ак 2-260 ДТ, Q53H, L90V, Q92H, G131E)(SEQ ID NO. 210732), CA2 (ак 2-260 ДТ, L44M, L47V, N62K, E69D)(SEQ ID NO. 210734), CA2 (ак 2-260 ДТ, D75V, K169N, F259L)(SEQ ID NO. 210738), CA2 (ак 2-260 ДТ, T207S, V222A, N231D)(SEQ ID NO. 210740), CA2 (ак 2-260 ДТ, I59F, V206M, G232R)(SEQ ID NO. 210742), CA2 (ак 2-260 ДТ, P13A, A133T)(SEQ ID NO. 210744), CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, R89I)(SEQ ID NO. 210750), CA2 (ак 2-260 ДТ, A65N, G86D, G131R, G155D, K158N, V162A, G170D, P236L)(SEQ ID NO. 210752), CA2 (ак 2-260 ДТ, G12R, H15Y, D19V)(SEQ ID NO. 210754), CA2 (ак 2-260 ДТ, A65V, F95Y, E106G, H107Q, I145M, F175I)(SEQ ID NO. 210758) и/или CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, E69V, N231I)(SEQ ID NO. 210851 или 210847).

[0027] В некоторых вариантах осуществления, ДД может содержать CA2 (ак 2-260 ДТ, R27L, H122Y), CA2 (ак 2-260 ДТ, T87I, H122Y), CA2 (ак 2-260 ДТ, H122Y, N252D), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, V241F), CA2 (ак 2-260 ДТ, V241F, P249L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71L, L250R), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249F), CA2 (ак 2-260 ДТ, T55K, G63N, Q248N), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, A257del, S258del, F259del, K260del), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, S2del, H3del, H4del, W5del), CA2 (ак 2-260 ДТ, W4Y, L156H), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, G234del, E235del, P236del), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, F225L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D70N, D74N, D100N, L156H), (CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, G102R)(SEQ ID NO: 210598), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, E69V, N231I)(SEQ ID NO. 210748), CA2 (ак 2-260 ДТ, R27L, T87I, H122Y, N252D)(SEQ ID NO. 210702), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, V241F, P249L)(SEQ ID NO. 210503), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71L, T87N, L250R)(SEQ ID NO. 210510), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, S172C, F178Y, E186D)(SEQ ID NO. 210756), CA2 (ак 2-260 ДТ, A77I, P249F)(SEQ ID NO. 210514), CA2 (ак 2-260 ДТ, E106D, C205S)(SEQ ID NO. 210523), CA2 (ак 2-260 ДТ, C205S, W208S)(SEQ ID NO. 210525), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73N, R89Y)(SEQ ID NO. 210532), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, T192F)(SEQ ID NO. 210534), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73N, R89F)(SEQ ID NO. 210562), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, M240L)(SEQ ID NO. 210578), CA2 (ак 2-260 ДТ, V134F, L228F)(SEQ ID NO. 210580) и/или CA2 (ак 2-260 ДТ, S56F, D71S)(SEQ ID NO. 210584).

[0028] SRE, описанные в настоящем документе, могут отвечать на один или более стимулов. Такими стимулы могут быть низкомолекулярными соединениями, такими как ацетазоламид, целекоксиб, вальдекоксиб, рофекоксиб, метазоламид, дорзоламид, бринзоламид, диклофенамид, этоксзоламид, зонисамид, дансиламид и дихлорфенамид, но не ограничиваясь ими. В одном из вариантов осуществления низкомолекулярное соединение может представлять собой ацетазоламид. В некоторых аспектах стимулом может быть целекоксиб.

[0029] В настоящем изобретении предложены системы биоциклов CA2, которые включают по меньшей мере один эффекторный модуль. Такие эффекторные модули могут включать элемент ответа на стимул (SRE). В настоящем документе предложены биоциклы с SRE, которые включают целую карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717) или ее область.

[0030] Полезная нагрузка, включенная в системы биоциклов CA2, может представлять собой терапевтический агент, природный белок, слитый полипептид, антитело или их вариант или фрагмент.

[0031] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка может представлять собой терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент может быть

цитокином, химерным антигенным рецептором, цитокином или слитым белком цитокин-цитокиновый рецептор.

[0032] Системы биоциклов CA2 могут отвечать на один или более стимулов. В одном аспекте, стимул может быть низкомолекулярным соединением, таким как ацетазоламид, целекоксиб, вальдекоксиб, рофекоксиб, метазоламид, дорзоламид, бринзоламид, диклофенамид, этоксзоламид, зонисамид, дансиламид и дихлорфенамид, но не ограничиваясь ими. В одном варианте осуществления низкомолекулярное соединение может представлять собой ацетазоламид. В другом аспекте низкомолекулярное соединение может представлять собой целекоксиб.

[0033] Также в настоящем документе предложены полинуклеотиды, кодирующие SRE, системы биоциклов и/или композиции, описанные в настоящем документе, а также векторы, включающие полинуклеотиды. В настоящем изобретении также описаны фармацевтические композиции, включающие биоцикл CA2 и/или композиции, описанные в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый эксципиент.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0034] Вышеизложенные и другие объекты, признаки и преимущества будут очевидны из следующего описания конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, как показано на сопровождающих графических материалах. Графические материалы не обязательно выполнены в масштабе; вместо этого акцент сделан на иллюстрации принципов различных вариантов осуществления настоящего изобретения.

[0035] На Фиг. 1 показана лиганд-зависимая регуляция химерных антигенных рецепторов CA2.

[0036] На Фиг. 2 показан ответ биоциклов CA2 на различные дозы ацетазоламида.

[0037] На Фиг. 3 показаны ответы на ацетазоламид OT-002347 (обозначен как CA2-070) и OT-001978 (обозначен как CA2-026).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0038] Подробности одного или более вариантов осуществления настоящего изобретения изложены в сопровождающем описании ниже. Хотя любые материалы и методы, аналогичные или эквивалентные описанным в настоящем документе, могут быть использованы на практике или при тестировании настоящего изобретения, далее описаны предпочтительные материалы и методы. Другие признаки, объекты и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из описания. В описании формы единственного числа также включают множественное число, если контекст явно не диктует иное. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимает специалист в области техники, к которой относится настоящее изобретение. В случае противоречия настоящее описание будет приоритетным.

I. КОМПОЗИЦИИ

Биоциклы или системы биоциклов

[0039] Согласно настоящему изобретению, предложены системы биоциклов, которые содержат, в своей основе, по меньшей мере один эффекторный модуль. Такие эффекторные модули независимо связаны или являются неотъемлемой частью одного или более элементов ответа на стимул (SRE). В общем, элемент ответа на стимул (SRE) может быть функционально связан с полезной нагрузкой, которая может представлять собой любой представляющий интерес белок (POI) (например, иммунотерапевтический агент), для формирования

эффекторного модуля. SRE, при активации определенным стимулом, например, низкомолекулярным соединением, может производить сигнал или результат, чтобы положительно или отрицательно регулировать уровни транскрипции и/или белка связанной полезной нагрузки, сохраняя стабилизирующий сигнал или дестабилизирующий сигнал, или любые другие виды регуляции. Более подробное описание системы биоцикла представлено в совместной предварительной патентной заявке США № 62/320864, поданной 11 апреля 2016 года, 62/466596, поданной 3 марта 2017 года, и международной публикации WO 2017/180587 (содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). В соответствии с настоящим изобретением предложены системы биоциклов, эффекторные модули, SRE и компоненты, которые настраивают уровни экспрессии и активность любых агентов, используемых для иммунотерапии.

[0040] Как используется в настоящем документе, термин «биоцикл» или «система биоцикла» определяется как цикл внутри биологических систем или пригодный для них, включающий стимул и по меньшей мере один эффекторный модуль, отвечающий на стимул, причем ответ на стимул производит по меньшей мере один сигнал или результат внутри, между, в качестве индикатора или на биологическую систему. Под биологическими системами обычно понимают любые клетки, ткани, органы, системы органов или организмы, будь то животные, растения, грибы, бактерии или вирусы. Также подразумевается, что биоциклы могут быть искусственными циклами, которые используют стимулы или эффекторные модули, описанные в настоящем изобретении, и воздействуют на сигналы или результаты в бесклеточной среде, такой как диагностические, репортерные системы, устройства, анализы или наборы. Искусственные циклы могут быть связаны с одним или более электронными, магнитными или радиоактивными компонентами или частями.

[0041] В соответствии с настоящим изобретением система биоцикла может представлять собой систему биоцикла дестабилизирующего домена (ДД), систему биоцикла химерного антигенного рецептора (CAR) (например, систему биоцикла I/O), систему биоцикла димеризации, систему биоцикла рецептора и систему биоцикла клетки. Любая из этих систем может действовать как сигнал для любой другой из этих систем биоциклов.

Эффекторные модули

[0042] Биоциклы по настоящему изобретению включают по меньшей мере один эффекторный модуль. Как используется в данном документе, термин «эффекторный модуль» представляет собой одно- или многокомпонентную конструкцию или комплекс, содержащий по меньшей мере (a) один или более элементов ответа на стимул (SRE) и (b) одну или более полезных нагрузок (например, представляющих интерес белков (POI)).

[0043] Эффекторные модули могут содержать одну или более полезных нагрузок, один или более SRE, один или более сайтов расщепления, одну или более сигнальных последовательностей и одну или более дополнительных признаков, включая наличие или отсутствие одного или более линкеров. Репрезентативные варианты осуществления эффекторного модуля по настоящему изобретению показаны на Фиг. 2-6 в Международной публикации № WO 2017/180587, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Биоциклы и компоненты, использующие такие эффекторные молекулы, приведены на Фиг. 7-12 в Международной публикации № WO 2017/180587, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[0044] Как показано на Фиг. 2 в Международной публикации № WO 2017/180587, репрезентативные варианты осуществления эффекторного модуля, включающие одну полезную нагрузку, т.е. показан один иммунотерапевтический агент. Каждый компонент эффекторного модуля может быть расположен или размещен в различных конфигурациях без (от A до F) или с (от G до Z, и от ак до DD) сайтом расщепления. Между каждым компонентом модуля эффектора может быть вставлен дополнительный линкер.

[0045] Фиг. 3-6 в Международной публикации № WO 2017/180587, иллюстрируют репрезентативные варианты осуществления модуля эффектора, содержащего две полезные нагрузки, т.е. два иммунотерапевтических агента. В некоторых аспектах более двух иммунотерапевтических агентов (полезных нагрузок) могут быть включены в эффекторный модуль под регуляцией одного и того же SRE (например, одного и того же ДД). Два или более агентов могут быть либо непосредственно связаны друг с другом, либо разделены. SRE может быть расположен на N-конце конструкции или на C-конце конструкции, или во внутреннем положении.

[0046] В некоторых вариантах осуществления биоциклы по настоящему изобретению могут быть модифицированы для снижения их иммуногенности. Иммуногенность является результатом сложного ряда реакций на вещество, которое воспринимается как чужеродное, и может включать выработку нейтрализующих и ненейтрализующих антител, образование иммунных комплексов, активацию комплемента, активацию тучных клеток, воспаление, реакции гиперчувствительности и анафилаксию. Иммуногенность белка может быть обусловлена несколькими факторами, включая последовательность белка, способ и частоту введения, а также популяцию пациентов, но не ограничиваясь ими. В предпочтительном варианте осуществления белковая инженерия может быть использована для снижения иммуногенности композиций по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления модификации для снижения иммуногенности могут включать модификации, которые уменьшают связывание процессированных пептидов, полученных из родительской последовательности, с белками ГКГС. Например, аминокислотные модификации могут быть сконструированы таким образом, что иммунные эпитопы, которые, как ожидается, будут связываться с высокой аффинностью с любыми преобладающими аллелями ГКГС, отсутствуют или их количество минимально. Несколько способов идентификации ГКГС-связывающих эпитопов известных белковых последовательностей известны в данной области и могут быть использованы для оценки эпитопов в композициях по настоящему изобретению. Такие способы раскрыты в патентной публикации США № US 20020119492, US 20040230380 и US 20060148009; содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[0047] Эффекторные модули, включая их SRE и полезные нагрузки, могут быть на основе нуклеиновых кислот, белков или их комбинации. Они могут быть в форме ДНК, РНК, мРНК, белков, слитых белков или любой комбинации вышеперечисленного.

[0048] Эффекторные модули, включая их SRE и полезную нагрузку, могут отдельно, совместно или независимо включать пептиды, полипептиды или белки. На уровне белка такой полезной нагрузкой может быть любой природный или искусственный пептид или полипептид, или их фрагмент. Природные пептиды или полипептидные компоненты полезной нагрузки могут быть получены из любого известного белка любого вида.

[0049] Эффекторные модули могут быть сконструированы для работы в группах из одного, двух, трех, четырех или более модулей. Когда в биоцикле используется более одного эффекторного модуля, он называется системой эффекторных модулей этого биоцикла.

Элемент ответа на стимул (SRE)

[0050] Как используется в настоящем документе, «элемент ответа на стимул» (SRE) представляет собой компонент эффекторного модуля, который присоединен, прикреплен, связан или ассоциирован с одной или более полезными нагрузками и в некоторых случаях отвечает за способность ответа эффекторного модуля на один или более стимулов. Как используется в настоящем документе, способность «ответа» SRE на стимул может характеризоваться ковалентным или нековалентным взаимодействием, прямой или непрямой ассоциацией, структурной или химической реакцией на стимул. Кроме того, ответ любого SRE на стимул может быть вопросом степени или вида. Ответ может быть частичным. Ответ может быть обратимым. В конечном итоге ответ может привести к появлению регулируемого сигнала или выхода. Такой выходной сигнал может иметь относительный характер по отношению к стимулу, например, оказывать модулирующий эффект от 1% до 100% или фактическое увеличение или уменьшение, например, 2-кратное, 3-кратное, 4-кратное, 5-кратное, 10-кратное или более. В некоторых вариантах осуществления SRE представляет собой полипептид, слитый с полипептидной полезной нагрузкой.

[0051] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены способы модуляции экспрессии, функции или уровня белка. В некоторых аспектах модуляция экспрессии, функции или уровня белка относится к модуляции экспрессии, функции или уровня по меньшей мере примерно на 20%, например, по меньшей мере примерно на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% и 100%, или по меньшей мере 20-30%, 20-40%, 20-50%, 20-60%, 20-70%, 20-80%, 20-90%, 20-95%, 20-100%, 30-40%, 30-50%, 30-60%, 30-70%, 30-80%, 30-90%, 30-95%, 30-100%, 40-50%, 40-60%, 40-70%, 40-80%, 40-90%, 40-95%, 40-100%, 50-60%, 50-70%, 50-80%, 50-90%, 50-95%, 50-100%, 60-70%, 60-80%, 60-90%, 60-95%, 60-100%, 70-80%, 70-90%, 70-95%, 70-100%, 80-90%, 80-95%, 80-100%, 90-95%, 90-100% или 95-100%.

Дестабилизирующие домены

[0052] Дестабилизирующие домены (ДД) представляют собой небольшие белковые домены, которые могут быть присоединены к представляющему интерес белку-мишени. Термин «дестабилизирующий домен» (ДД) взаимозаменяем с термином «домен, реагирующий на лекарственные препараты» (ДРП). ДД делают присоединенный представляющий интерес белок нестабильным в отсутствие ДД-связывающего лиганда, так что белок быстро разрушается убиквитин-протеасомной системой клетки (Stankunas, K., et al., Mol. Cell, 2003, 12: 1615–1624; Banaszynski, *et al.*, Cell; 2006, 126(5): 995–1004; обзор представлен в Banaszynski, L.A., и Wandless, T.J. *Chem. Biol.*; 2006, 13:11–21 и Rakhit R et al., *Chem Biol.* 2014; 21(9):1238-1252). Однако, когда специфический низкомолекулярный лиганд связывает предполагаемый ДД в качестве партнера по связыванию лиганда, нестабильность обращается вспять, и функция белка восстанавливается. Условный характер стабильности ДД позволяет быстро и без пертурбаций переключаться со стабильного белка на нестабильный субстрат для деградации. Более того, его зависимость от концентрации лиганда позволяет регулировать скорость деградации.

[0053] В одном варианте осуществления SRE представляет собой дестабилизирующий домен (ДД). Наличие, отсутствие или количество низкомолекулярного лиганда, который связывается или взаимодействует

с ДД, может при таком связывании или взаимодействии модулировать стабильность полезной нагрузки (полезных нагрузок) и, следовательно, функцию полезной нагрузки. В зависимости от степени связывания и/или взаимодействия измененная функция полезной нагрузки может меняться, что обеспечивает «настройку» функции полезной нагрузки.

[0054] В некоторых вариантах осуществления желаемые характеристики ДД могут включать низкие уровни белка в отсутствие лиганда ДД (например, низкая основная стабильность), большой динамический диапазон, надежное и предсказуемое поведение доза-ответ и быстрая кинетика деградации, но не ограничиваются ими. Предпочтительными могут быть ДД, которые связываются с желаемым лигандом, но не с эндогенными молекулами.

[0055] В некоторых вариантах осуществления ДД по настоящему изобретению могут быть разработаны на основе известных белков, называемых в данном документе родительским белком. В некоторых вариантах осуществления дестабилизирующие домены CA2, описанные в настоящем документе или известные в данной области, могут быть применены в качестве SRE в системах биоциклов по настоящему изобретению совместно с любой из полезных нагрузок (например, представляющими интерес белками или иммунотерапевтическими агентами), описанными в настоящем документе.

[0056] Области, части или домены белков дикого типа (например, CA2) могут быть использованы в качестве SRE/ДД полностью или частично. Они могут быть объединены или перегруппированы для создания новых пептидов, белков, областей или доменов, любой из которых может быть использован в качестве SRE/ДД или отправной точки для разработки дальнейших SRE и/или ДД.

[0057] В одном варианте осуществления SRE получен из области родительского белка (например, CA2) или из мутантного белка. Область родительского белка может составлять 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450 или более 450 аминокислот в длину. Область родительского белка может составлять 5-50, 25-75, 50-100, 75-125, 100-150,

125-175, 150-200, 175-225, 200-250, 225-275, 250-300, 275-325, 300-350, 325-375, 350-400, 375-425 или 400-450 аминокислот в длину. В качестве неограничивающего примера, область родительского белка может иметь длину 250-270 аминокислот. В качестве неограничивающего примера, область родительского белка может иметь длину 225-250 аминокислот. В качестве неограничивающего примера, область родительского белка может иметь длину 225-260 аминокислот.

[0058] В одном варианте осуществления SRE получен из родительского белка (например, CA2) или из мутантного белка и содержит область родительского белка. SRE может содержать область родительского белка, которая составляет 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100%, 5-10%, 10-15%, 15-20%, 20-25%, 25-30%, 30-35%, 35-40%, 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-100%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90%, 90-100%, 10-30%, 20-40%, 30-50%, 40-60%, 50-70%, 60-80%, 70-90%, 80-100%, 10-40%, 20-50%, 30-60%, 40-70%, 50-80%, 60-90%, 70-100%, 10-50%, 20-60%, 30-70%, 40-80%, 50-90%, 60-100%, 10-60%, 20-70%, 30-80%, 40-90%, 50-100%, 10-70%, 20-80%, 30-90%, 40-100%, 10-80%, 20-90%, 30-100%, 10-90%, 20-100%, 25-50%, 50-75% или 75-100% родительского белка или мутантного белка.

[0059] В одном варианте осуществления SRE получен из родительского белка (например, CA2) или из мутантного белка и может иметь 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100%, 5-10%, 10-15%, 15-20%, 20-25%, 25-30%, 30-35%, 35-40%, 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-100%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90%, 90-100%, 10-30%, 20-40%, 30-50%, 40-60%, 50-70%, 60-80%, 70-90%, 80-100%, 10-40%, 20-50%, 30-60%, 40-70%, 50-80%, 60-90%, 70-100%, 10-50%, 20-60%, 30-70%, 40-80%, 50-90%, 60-100%, 10-60%, 20-70%, 30-80%, 40-90%, 50-100%, 10-70%, 20-80%, 30-90%, 40-100%, 10-80%, 20-90%, 30-100%, 10-90%, 20-100%, 25-50%, 50-75% или 75-100% идентичности по отношению к родительскому белку или мутантному белку.

[0060] Последовательность потенциального дестабилизирующего домена, идентифицированная из белковых доменов родительских белков (в качестве шаблона), может быть мутирована для создания библиотек мутантов, основанных на шаблоне последовательности потенциального домена. Стратегии мутагенеза, используемые для создания библиотек ДД, могут включать сайт-направленный мутагенез, например, с помощью применения структурно-направленной информации; или случайный мутагенез, например, применение ПЦР с ошибками, или комбинацию обоих методов. В некоторых вариантах осуществления дестабилизирующие домены, идентифицированные с помощью случайного мутагенеза, могут быть использованы для идентификации структурных свойств потенциальных ДД, которые могут быть необходимы для дестабилизации, которые затем могут быть использованы для дальнейшего создания библиотек мутаций с помощью сайт-направленного мутагенеза.

[0061] В некоторых вариантах осуществления библиотеки мутантных ДД могут быть проверены на наличие мутаций с измененной, предпочтительно более высокой аффинностью связывания с лигандом по сравнению с белком дикого типа. Библиотеки ДД также могут быть проверены с использованием двух или более лигандов, и мутации ДД, которые стабилизируются одними лигандами, но не стабилизируются другими, могут быть предпочтительно выбраны. Также могут быть отобраны мутации ДД, которые предпочтительно связываются с лигандом по сравнению с встречающимся в природе белком. Такие методы

могут быть использованы для оптимизации выбора лиганда и аффинности связывания лиганда с ДД. Кроме того, такие подходы могут быть использованы для уменьшения вредных последствий, вызванных нецелевым связыванием лиганда.

[0062] В некоторых вариантах осуществления пригодные ДД могут быть идентифицированы путем скрининга библиотек мутантов с использованием штрих-кодов. Такие методы могут быть использованы для обнаружения, идентификации и количественной оценки отдельных мутантных клонов в гетерогенной библиотеке мутантов. Каждый мутантный ДД в библиотеке может иметь различные последовательности штрих-кодов (по отношению друг к другу). В других случаях полинуклеотиды могут также иметь различные последовательности штрих-кода в отношении 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более оснований нуклеиновой кислоты. Каждый мутантный ДД в библиотеке может также включать множество последовательностей штрих-кода. При использовании во множественном числе может быть использовано так, что каждый штрих-код уникален по отношению к любому другому штрих-коду. В качестве альтернативы, каждый используемый штрих-код может быть не уникальным, но комбинация используемых штрих-кодов может создать уникальную последовательность, которую можно отслеживать по отдельности. Последовательность штрих-кода может быть расположена выше от SRE, ниже от SRE или в некоторых случаях может быть расположена внутри SRE. Мутантные ДД могут быть идентифицированы по штрих-кодам с помощью таких методов секвенирования, как секвенирование по Сэнгеру и секвенирование следующего поколения, а также с помощью полимеразной цепной реакции и количественной полимеразной цепной реакции. В некоторых вариантах осуществления праймеры для полимеразной цепной реакции, которые амплифицируют продукт разного размера для каждого штрих-кода, могут быть использованы для идентификации каждого штрих-кода на агарозном геле. В других случаях каждый штрих-код может иметь уникальную последовательность зонда для количественной полимеразной цепной реакции, которая позволяет целенаправленно амплифицировать каждый штрих-код.

[0063] В одном варианте осуществления эффекторные модули и/или SRE по настоящему изобретению могут включать по меньшей мере один дестабилизирующий домен (ДД). Эффекторные модули и/или SRE могут включать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 ДД. Когда имеется более одного ДД, каждый из ДД может быть получен из одного и того же родительского белка, из разных родительских белков, может быть слитым белком двух разных родительских белков или может быть искусственным.

[0064] В одном варианте осуществления эффекторные модули и/или SRE по настоящему изобретению могут включать 2 ДД. В одном варианте осуществления эффекторные модули и/или SRE по настоящему изобретению могут включать 3 ДД. В одном варианте осуществления эффекторные модули и/или SRE по настоящему изобретению могут включать 4 ДД. В одном варианте осуществления эффекторные модули и/или SRE по настоящему изобретению могут включать 5 ДД. В одном варианте осуществления эффекторные модули и/или SRE по настоящему изобретению могут включать 6 ДД. В одном варианте осуществления эффекторные модули и/или SRE по настоящему изобретению могут включать 7 ДД. В одном варианте осуществления эффекторные модули и/или SRE по настоящему изобретению могут включать 8 ДД. В одном варианте осуществления эффекторные модули и/или SRE по настоящему изобретению могут включать 9 ДД. В одном варианте осуществления эффекторные модули и/или SRE по настоящему изобретению могут включать 10 ДД. ДД могут быть получены из любого родительского белка, известного в данной области и/или описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления ДД получены из одного и того

же родительского белка. В некоторых вариантах осуществления ДД получены из разных областей одного и того же родительского белка. В некоторых вариантах осуществления ДД получены из разных родительских белков.

Дестабилизирующие домены CA2

[0065] В некоторых вариантах осуществления ДД по настоящему изобретению могут быть получены из карбоангидразы 2 CA2 человека, которая является членом карбоновых ангидраз (CA, EC 4.2.1.1) суперсемейства металлоферментов, присутствующих во всех биологических царствах. CA уравновешивают реакцию между тремя видами химических молекул: CO2, бикарбонатом и протонами. CA эволюционировали конвергентно, с семью генетически различными семействами CA, которые развивались независимо у бактерий, архей и эукариот - α-, β-, γ-, δ-, ζ-, η- и θ-CA. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе ДД могут быть получены из по меньшей мере одного родительского белка, выбранного из карбоангидразы 2 (CA2), карбоангидразы 1 (CA1), карбоангидразы 3 (CA3), карбоангидразы 4 (CA4), карбоангидразы 5A (CA5A), карбоангидразы 5B (CA5B), карбоангидразы 6 (CA6), карбоангидразы 7 (CA7), карбоангидразы 8 (CA8), карбоангидразы 9 (CA9), карбоангидразы 10 (CA10), карбоангидразы 11 (CA11), карбоангидразы 12 (CA12), карбоангидразы 13 (CA13) и карбоангидразы 14 (CA14), но не ограничиваясь ими.

[0066] В одном варианте осуществления ДД могут быть получены из цитозольных CA, таких как карбоангидраза 2 (CA2), карбоангидраза 1 (CA1), карбоангидраза 3 (CA3), карбоангидраза 7 (CA7) и карбоангидраза 13 (CA13), но не ограничиваясь ими. В одном варианте осуществления ДД могут быть получены из митохондриальных CA, таких как карбоангидраза 5A (CA5A) и карбоангидраза 5B (CA5B), но не ограничиваясь ими. В одном варианте осуществления ДД могут быть получены из секретируемых CA, таких как карбоангидраза 6 (CA6), но не ограничиваясь ею. В одном варианте осуществления ДД могут быть получены из ассоциированных с мембраной CA, таких как карбоангидраза 4 (CA4), карбоангидраза 9 (CA9), карбоангидраза 12 (CA12) и карбоангидраза 14 (CA14), но не ограничиваясь ими. В одном варианте осуществления ДД получен из CA2. В другом аспекте ДД может быть получен из CA9.

[0067] В некоторых вариантах осуществления ДД по настоящему изобретению могут быть получены из CA2 (SEQ ID NO: 11717; Uniprot ID: P00918), которые могут быть стабилизированы лигандами, такими как низкомолекулярные ингибиторы CA2. Используемый в настоящем документе термин «CA2 ДТ» относится к последовательности белка CA2 человека дикого типа, которая определена как SEQ ID NO: 11717, с номером доступа GenBank № P00918, имеющей аминокислотную последовательность: MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEF DDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPD GLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIV LKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK. В некоторых аспектах ДД могут быть получены из CA2 с SEQ ID NO: 11718 (имеющей аминокислотную последовательность: MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEF DDSQDKAASLGSLEHQIWGFWESCAAT) или SEQ ID NO. 11719 (имеющей аминокислотную последовательность:
MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEF DDSQDKAEKGISMLRKKDVKNIHSPDNACEE). В некоторых вариантах осуществления ДД по настоящему изобретению могут быть идентифицированы с помощью смеси ингибиторов CA2. В других случаях

пригодные ДД могут быть определены путем скрининга сначала с одним ингибитором CA2 и последующего скрининга со вторым ингибитором CA2.

[0068] Аминокислотные последовательности дестабилизирующих доменов, охватываемых изобретением, имеют по крайней мере около 40%, 50 или 60% идентичности, дополнительно по крайней мере около 70% идентичности, предпочтительно по крайней мере около 75% или 80% идентичности, более предпочтительно по крайней мере около 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90% идентичности, и дополнительно предпочтительно по крайней мере около 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в данном документе. Процент идентичности может быть определен, например, путем сравнения информации о последовательности с помощью усовершенствованной компьютерной программы BLAST, включая версию Magic-BLAST 1.2.0, доступную в Национальных институтах здоровья. Программа BLAST основана на методе выравнивания, рассмотренном в Karl and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci USA, 87:2264-68 (содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме).

[0069] В некоторых вариантах осуществления ДД, полученные из CA2, могут включать аминокислоты 2-260 родительской последовательности CA2. В настоящем документе это называется мутацией M1del. В одном варианте осуществления ДД, полученные из CA2, могут включать аминокислоты 2-237 родительской последовательности CA2.

[0070] В Таблице 1, Таблице 2, Таблице 3, Таблице 4 и Таблице 6 представлены мутантные CA2, идентифицированные с помощью мутагенеза, такого как скрининг случайного мутагенеза, с использованием комбинации мутагенеза нуклеотидных аналогов и ПЦР с ошибками для создания библиотек мутантов; или насыщающего мутагенеза. Дестабилизирующие мутантные CA2 также могут быть идентифицированы с помощью структурно-направленного мутагенеза и представлены в Таблице 1. Положение мутировавших аминокислот, перечисленных в Таблице 1, Таблице 2, Таблице 3, Таблице 4, Таблице 5 и Таблице 6, указано относительно полной длины CA2 из SEQ ID NO: 11717.

Таблица 1: ДД CA2

Идентификатор библиотеки	**Описание**	**АМИНОКИСЛ. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ**	**Аминокисл. SEQ ID NO.**	**Нуклеот. SEQ ID NO.**
-				

	CA2 (ак 2-260 ДТ)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21049 2	21049 3
-	CA2 (ак 2-260 ДТ, W208S)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTSIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21049 4	21049 5
LibC00 0103	CA2 (ак 2-260 ДТ, Y51N)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSNDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21049 6	21049 7
LibC00 0101	CA2 (ак 2-260 ДТ, S56N)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATNLRILNNGHAFNVEFDD SQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21049 8	21049 9
LibC00 0098		SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSTDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS	21050 0	21050 1

LibC00 0097	CA2 (ак 2-260 ДТ, Y51T)	QDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK		21050 2
LibC00 0095	CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, V241F, P249L)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDFS QDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMFDNWRPAQLLKN RQIKASFK	21050 3	21050 4
LibC00 0084	CA2 (ак 2-260 ДТ, D71F, N231F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFFDS QDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFFGEGEPEELMVDNWRPAQPLKN RQIKASFK	21050 5	21050 6
LibC00 0079	CA2 (ак 2-260 ДТ, S56F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATFLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21050 7	21050 8
LibC00 0078				21050 9
LibC00 0073	CA2 (ак 2-260 ДТ, D71L, T87N, L250R)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFLDS QDKAVLKGGPLDGNYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPRK NRQIKASFK	21051 0	21051 1

LibC000090	CA2 (ак 2-260 ДТ, L183S)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGSLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210512	210513
LibC000076	CA2 (ак 2-260 ДТ, A77I, P249F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKIVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQFLKNRQIKASFK	210514	210515
LibC000099	CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, P249H)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFKDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQHLKNRQIKASFK	210516	210517
LibC000081	CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249H)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDFSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQFLKNRQIKASFK	210518	210519
LibC000065				210520

LibC00 0082	CA2 (ак 2-260 ДТ, Q53N, N61Y)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDNATSLRILYNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21052 1	21052 2
-	CA2 (ак 2-260 ДТ, E106D, C205S)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSDHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLESVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21052 3	21052 4
-	CA2 (ак 2-260 ДТ, C205S, W208S)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLESVTSIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21052 5	21052 6
-	CA2 (ак 2-260 ДТ, C205S)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLESVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21052 7	21052 8
LibC00 0066		SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS	21052 9	21053 0

LibC000069	CA2 (ак 2-260 ДТ, Y193I)	QDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTIPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK		210531
LibC000056	CA2 (ак 2-260 ДТ, S73N, R89Y)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDNQDKAVLKGGPLDGTYYLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210532	210533
LibC000057	CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, T192F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFKDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWFYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210534	210535
LibC000061	CA2 (ак 2-260 ДТ, E238*)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPE*LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210536; 210696	210537
LibC000061	CA2 (ак 2-260 ДТ, G144D)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLDIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210538	210539

LibC00 0092	CA2 (ак 2-260 ДТ, Y193L, K260L)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTLPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFL	21054 0	21054 1
LibC00 0053	CA2 (ак 2-260 ДТ, V206M)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECMTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21054 2	21054 3
LibC00 0054	CA2 (ак 2-260 ДТ, D71F, V241F, P249L)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFFDS QDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMFDNWRPAQLLKN RQIKASFK	21054 4	21054 5
LibC00 0055	CA2 (ак 2-260 ДТ, Y193F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTFPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21054 6	21054 7

LibC00 0058	CA2 (ак 2-260 ДТ, L147F, Q248F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFFKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAFPLKN RQIKASFK	21054 8	21054 9
LibC00 0059	CA2 (ак 2-260 ДТ, D52I, S258P)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYIQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKAPFK	21055 0	21055 1
LibC00 0060	CA2 (ак 2-260 ДТ, D72S, T192N)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDSS QDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWNYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21055 2	21055 3
LibC00 0062	CA2 (ак 2-260 ДТ, D179E, T192I)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFE PRGLLPESLDYWIYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISV SSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKN RQIKASFK	21055 4	21055 5

LibC00 0063	CA2 (ак 2-260 ДТ, Y193L)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTLPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21055 6	21055 7
LibC00 0064	CA2 (ак 2-260 ДТ, S56N, Q103K)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATNLRILNNGHAFNVEFDD SQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGKGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21055 8	21055 9
LibC00 0067	CA2 (ак 2-260 ДТ, D71Y, Q248L)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFYDS QDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPALPLKN RQIKASFK	21056 0	21056 1
LibC00 0068	CA2 (ак 2-260 ДТ, S73N, R89F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDD NQDKAVLKGGPLDGTYFLIQFHFHWGSLDGQGSEH TVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLA VLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTN FDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21056 2	21056 3

LibC000070	CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, N231L, E235G, L239F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFKDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFLGEGGPEEFMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210564	210565
LibC000071	CA2 (ак 2-260 ДТ, D71F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFFDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210566	210567
LibC000072	CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249I)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDFSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQILKNRQIKASFK	210568	210569
LibC000074	CA2 (ак 2-260 ДТ, T192N)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWNYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210570	210571

LibC00 0075	CA2 (ак 2-260 ДТ, D72X, V241X, P249X)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDXS QDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMXDNWRPAQXLK NRQIKASFK	21057 2	21057 3
LibC00 0077	CA2 (ак 2-260 ДТ, A54X, S56X, L57X, T192X)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQXTXXRILNNGHAFNVEFDD SQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWXYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21057 4	21057 5
LibC00 0080	CA2 (ак 2-260 ДТ, Y193V, K260F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTVPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFF	21057 6	21057 7
LibC00 0085	CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, M240L)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNDHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELLVDNWRPAQPLKN RQIKASFK	21057 8	21057 9

LibC00 0086	CA2 (ак 2-260 ДТ, V134F, L228F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAFQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKFNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21058 0	21058 1
LibC00 0087	CA2 (ак 2-260 ДТ, D71G, N231K)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFGDS QDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFKGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21058 2	21058 3
LibC00 0088	CA2 (ак 2-260 ДТ, S56F, D71S)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATFLRILNNGHAFNVEFSDS QDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21058 4	21058 5
LibC00 0089	CA2 (ак 2-260 ДТ, D52L, G128R, Q248F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYLQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYRDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAFPLKN RQIKASFK	21058 6	21058 7

LibC00 0091	CA2 (ак 2-260 ДТ, S73X, R89X)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDD XQDKAVLKGGPLDGTYXLIQFHFHWGSLDGQGSEH TVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLA VLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTN FDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21058 8	21058 9
LibC00 0093	CA2 (ак 2-260 ДТ, Y193X)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDS QDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTXPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21059 0	21059 1
LibC00 0096	CA2 (ак 2-260 ДТ, Y51X, D72X, V241X, P249X)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSXDQATSLRILNNGHAFNVEFDXS QDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAV LGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNF DPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPIS VSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMXDNWRPAQXLK NRQIKASFK	21059 2	21059 3
LibC00 0100	CA2 (ак 2-260 ДТ, D72I, W97C)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTH TAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDIS QDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHCGSLDGQGSEHTV DKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVL GIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFD PRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISV SSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKN RQIKASFK	21059 4	21059 5

LibC000102	CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, T192F, N231F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFKDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWFYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFFGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210596	210597
-	CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, G102R)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRNLNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDRQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210598	210599
LibC000210				210847
LibC000184				210848
LibC000187				210849
-	CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGHQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210600	210601
LibC000208				210850
-	CA2 (L156H)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGHQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210602	210603
Усечен. LibC000061	CA2 (ак 2-237 ДТ)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPE	210536	210697

[0071] Дополнительные дестабилизирующие домены CA2 представлены в Таблице 2.

Таблица 2: ДД CA2

Идентификатор библиотеки	**Описание**	**АМИНОКИСЛ. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ**	**Аминокисл. SEQ ID NO.**	**Нуклеот. SEQ ID NO.**
LibC000229	CA2 (ак 2-260 ДТ, H36Q, S43T, Y51F, N67D, G131W, R226H)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTQTAKYDPTLKPLSVSFDQATSLRILNNGHAFDVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFWKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFHKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210698	210699
LibC000228	CA2 (ак 2-260 ДТ, F70I, F146V)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEIDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIVLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210700	210701
LibC000226	CA2 (ак 2-260 ДТ, R27L, T87I, H122Y, N252D)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGELQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGIYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVYWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKDRQIKASFK	210702	210703
LibC000225	CA2 (ак 2-260 ДТ, K45N, V68L, H119Y, K169R, D179E)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLNPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNLEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELYLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTRGKSADFTNFEPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210704	210705

LibC000224	CA2 (ак 2-260 ДТ, H15L, A54V, K111E, E220K, F225I)	SHHWGYGKHNGPELWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQVTSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDEKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSKQVLKIRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210706	210707
LibC000221	CA2 (ак 2-260 ДТ, P13S, P83A, D101G, K111N, F230I)	SHHWGYGKHNGSEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGALDGTYRLIQFHFHWGSLGGQGSEHTVDNKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNINGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210708	210709
LibC000220	CA2 (ак 2-260 ДТ, L47R)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPRSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210710	210711
LibC000219	CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, W123R, E220K)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNDHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHRNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSKQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210712	210713
LibC000217	CA2 (ак 2-260 ДТ, N11D, E69K, G86D, V109M, K113I, T125I,	SHHWGYGKHDGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVKFDDSQDKAVLKGGPLDDTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTMDKKIYAAELHLVHWNIKYGDFGKAVQQPGGLAVLGIFLKVGSAKPSLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLL	210714	210715

	D138G, G155S)	ECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK		
LibC000214	CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, G102R, A173T)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRNLNNGHAFNV EFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDR QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAV QQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKT KGKSTDFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLL ECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210716	210717
LibC000213	CA2 (ак 2-260 ДТ, L79F, P180S)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNV EFDDSQDKAVFKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDG QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAV QQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKT KGKSADFTNFDSRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLL ECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210718	210719
LibC000212	CA2 (ак 2-260 ДТ, S73F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNV EFDDFQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDG QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAV QQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKT KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLL ECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210720	210721
LibC000211	CA2 (ак 2-260 ДТ, G12R)	SHHWGYGKHNRPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNV EFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDG QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAV QQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKT KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLL ECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210722	210723
LibC000209	CA2 (ак 2-260 ДТ,	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNV	210724	210725

	A77P, G102R, D138N)	EFDDSQDKPVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDR QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAV QQPNGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKT KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLL ECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK		
LibC000183	CA2 (ак 2-260 ДТ, F20L, K45N, G63D, E69V, N231I)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDLPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLNPLSVSYDQATSLRILNNDHAFNV VFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLD GQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKA VQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIK TKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPL LECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFIGEGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210726	210727
LibC000207	CA2 (ак 2-260 ДТ, T199N, L202P, L228F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNV EFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDG QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAV QQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKT KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTNPPPL ECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKFNFNGEGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210728	210729
LibC000206	CA2 (ак 2-260 ДТ, K9N, H122Y, T168K)	SHHWGYGNHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNV EFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDG QGSEHTVDKKKYAAELHLVYWNTKYGDFGKAV QQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKK KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLL ECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210730	210731
LibC000205	CA2 (ак 2-260 ДТ, Q53H, L90V, Q92H, G131E)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDHATSLRILNNGHAFNV EFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRVIHFHFHWGSLD GQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFEKA VQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIK TKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPL LECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPE ELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210732	210733

LibC000204	CA2 (ак 2-260 ДТ, L44M, L47V, N62K, E69D)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSMKPVSVSYDQATSLRILNKGHAFNVDFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210734	210735
LibC000203	CA2 (ак 2-260 ДТ, F20L, K45N, G104R, A116V)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDLPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLNPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQRSEHTVDKKKYAVELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210736	210737
LibC000202	CA2 (ак 2-260 ДТ, D75V, K169N, F259L)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQVKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTNGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASLK	210738	210739
LibC000182	CA2 (ак 2-260 ДТ, T207S, V222A, N231D)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVSWIVLKEPISVSSEQALKFRKLNFDGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210740	210741
LibC000201	CA2 (ак 2-260 ДТ, I59F, V206M, G232R)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRFLNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLL	210742	210743

		ECMTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNREGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK		
LibC000199	CA2 (ак 2-260 ДТ, P13A, A133T)	SHHWGYGKHNGAEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNV EFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDG QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKTV QQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKT KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLL ECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210744	210745
LibC000198	CA2 (ак 2-260 ДТ, N61R, K80M, K212N, N231T, L250P)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILRNGHAFNV EFDDSQDKAVLMGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLD GQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKA VQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIK TKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPL LECVTWIVLNEPISVSSEQVLKFRKLNFTGEGEPE ELMVDNWRPAQPPKNRQIKASFK	210746	210747
LibC000196	CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, E69V, N231I)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNDHAFNV VFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLD GQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKA VQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIK TKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPL LECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFIGEGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210748	210749
LibC000181	CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, R89I)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRNLNNGHAFNV EFDDSQDKAVLKGGPLDGTYILIQFHFHWGSLDG QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAV QQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKT KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLL ECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210750	210751
LibC000194	CA2 (ак 2-260 ДТ, A65N, G86D,	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHNFNV EFDDSQDKAVLKGGPLDDTYRLIQFHFHWGSLDG	210752	210753

	G131R, G155D, K158N, V162A, G170D, P236L)	QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFRKAV QQPDGLAVLGIFLKVGSAKPDLQNVVDALDSIKT KDKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLL ECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGELEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK		
LibC000192	CA2 (ак 2-260 ДТ, G12R, H15Y, D19V)	SHHWGYGKHNRPEYWHKVFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNV EFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDG QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAV QQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKT KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLL ECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210754	210755
LibC000193	CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, S172C, F178Y, E186D)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNV EFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDG QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAV QQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGHQKVVDVLDSIKT KGKCADFTNYDPRGLLPDSLDYWTYPGSLTTPPL LECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPE ELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210756	210757
LibC000189	CA2 (ак 2-260 ДТ, A65V, F95Y, E106G, H107Q, I145M, F175I)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHVFNV EFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHYHWGSLD GQGSGQTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKA VQQPDGLAVLGMFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSI KTKGKSADITNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEP EELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210758	210759
LibC000186	CA2 (ак 2-260 ДТ, L197P)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDID THTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNV EFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDG QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAV QQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKT KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSPTTPPLL ECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210760	210761
-				

	CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, E69V, N231I)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNDHAFNVVFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFIGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210851	210852

[0072] В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе ДД CA2 могут включать любую из последовательностей, представленных в Таблице 3. В Таблице 3 «*» обозначает трансляцию стоп-кодона. Если аминокислотная последовательность в Таблице 3 содержит один или более стоп-кодонов, в колонке «акSEQ ID» указывается SEQ ID NO: отдельных компонентов, предшествующих и следующих за стоп-кодоном, в том порядке, в котором они встречаются в аминокислотной последовательности.

Таблица 3: ДД CA2

Идентификатор библиотеки	**Описание**	**АМИНОКИСЛ. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ**	**Аминокисл. SEQ ID NO.**	**Нуклеот. SEQ ID NO.**
LibC000223	CA2 (ак 2-260 ДТ, G12E, A38V, A65V, G98V, S99H, D101M, G102D, Q103K, G104V, S105Q, E106S, H107I, T108L, V109W, D110I, K112R, K113N, Y114M, A115L, A116Q, E117N, L118F, H119T, L120W, V121F, H122T, W123G, N124T, T125P, K126N, Y127M, D129I, F130L, K132E, A133L, V134C, Q135S, Q136N, P137L, D138M, G139D, L140W, A141P, V142F, L143*, G144V, I145F, L156Q, V162A)	SHHWGYGKHNEPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTVKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHVFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWVHLMDKVQSILWIKRNMLQNFTWFTGTPNMGILGELCSNLMDWPF*VFFLKVGSAKPGQQKVVDALDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210762; 210763	210764
LibC000185	CA2 (ак 2-260 ДТ, F20L, K45N, G104R, A116V, A173G, W191*)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDLPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLNPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPL	210765;210766	210767

		DGTYRLIQFHFHWGSLDGQRS EHTVDKKKYAVELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIF LKVGSAKPGLQKVVDVLDSIK TKGKSGDFTNFDPRGLLPESL DY*TYPGSLTTPPLLECVTWIV LKEPISVSSEQVLKFRKLNFNG EGEPEELMVDNWRPAQPLKN RQIKASFK		
LibC000215	CA2 (ак 2-260 ДТ, H17D, P30S, G81V, K132R, S151I, A152D, A173G, W191*)	SHHWGYGKHNGPEHWDKDFP IAKGERQSSVDIDTHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSQDKAVLKVGPL DGTYRLIQFHFHWGSLDGQGS EHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGRAVQQPDGLAVLGIF LKVGIDKPGLQKVVDVLDSIK TKGKSGDFTNFDPRGLLPESL DY*TYPGSLTTPPLLECVTWIV LKEPISVSSEQVLKFRKLNFNG EGEPEELMVDNWRPAQPLKN RQIKASFK	21076 8; 21076 6	210769
LibC000191	CA2 (ак 2-260 ДТ, H17D, P30S, G81V, K132R, S151I, A152D, A173G, W191*)	SHHWGYGKHNGPEHWDKDFP IAKGERQSSVDIDTHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSQDKAVLKVGPL DGTYRLIQFHFHWGSLDGQGS EHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGRAVQQPDGLAVLGIF LKVGIDKPGLQKVVDVLDSIK TKGKSGDFTNFDPRGLLPESL DY*TYPGSLTTPPLLECVTWIV LKEPISVSSEQVLKFRKLNFNG EGEPEELMVDNWRPAQPLKN RQIKASFK	21076 8; 21076 6	210770
LibC000200	CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, L90*, G102R)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDTHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRNLNNGH AFNVEFDDSQDKAVLKGGPL	21077 1;2107 72	210773

		DGTYR*IQFHFHWGSLDRQGS EHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIF LKVGSAKPGLQKVVDVLDSIK TKGKSADFTNFDPRGLLPESL DYWTYPGSLTTPPLLECVTWI VLKEPISVSSEQVLKFRKLNFN GEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK		
LibC000197	CA2 (ак 2-260 ДТ, T35I, Y114H, P154L, D161V, P200A, Q221R, F225L, E233D, W244*)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDIHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSQDKAVLKGGPL DGTYRLIQFHFHWGSLDGQGS EHTVDKKKHAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIF LKVGSAKLGLQKVVVVLDSIK TKGKSADFTNFDPRGLLPESL DYWTYPGSLTTAPLLECVTWI VLKEPISVSSERVLKLRKLNFN GDGEPEELMVDN*RPAQPLKN RQIKASFK	21077 4; 21077 5	210776
LibC000195	CA2 (ак 2-260 ДТ, S105L, L140V, G155C, Y190*)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDTHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSQDKAVLKGGPL DGTYRLIQFHFHWGSLDGQGL EHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGVAVLGI FLKVGSAKPCLQKVVDVLDSI KTKGKSADFTNFDPRGLLPES LD*WTYPGSLTTPPLLECVTWI VLKEPISVSSEQVLKFRKLNFN GEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	21077 7;2107 78	210779
LibC000188	CA2 (ак 2-260 ДТ, T35I, Y114H, P154L, D161V, P200A, F225L, E233D, W244*)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDIHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSQDKAVLKGGPL	21078 0; 21077 5	210781

		DGTYRLIQFHFHWGSLDGQGS EHTVDKKKHAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIF LKVGSAKLGLQKVVVVLDSIK TKGKSADFTNFDPRGLLPESL DYWTYPGSLTTAPLLECVTWI VLKEPISVSSEQVLKLRKLNFN GDGEPEELMVDN*RPAQPLKN RQIKASFK		
LibC000180	CA2 (ак 2-260 ДТ, K167*, R181H, E213*, V217L, L228H)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDTHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSQDKAVLKGGPL DGTYRLIQFHFHWGSLDGQGS EHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIF LKVGSAKPGLQKVVDVLDSI* TKGKSADFTNFDPHGLLPESL DYWTYPGSLTTPPLLECVTWI VLK*PISLSSEQVLKFRKHNFN GEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFK	210782; 210783; 210784	210785
LibC000190	CA2 (ак 2-259 ДТ, K167*, R181H, P194Q, G195A, S196H, L197*, T198P, T199P, P200L, P201L, L202F, L203W, E204N, C205V, V206*, T207P, W208G, I209L, V210C, L211S, K212R, E213N, I215S, S216A, V217S, S218A, S219A, E220S, Q221R, V222C, L223*, K224N, F225S, R226V, K227N, N229T, F230S, N231M, E233R, G234L, E235N, E237K, E238N, L239*, M240W, V241W, D242T, N243T, W244G, R245A, P246Q, A247L, Q248S, P249H, L250*, K251R, N252T, R253G, Q254K, I255S, A257L, S258P, F259S)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDTHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSQDKAVLKGGPL DGTYRLIQFHFHWGSLDGQGS EHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIF LKVGSAKPGLQKVVDVLDSI* TKGKSADFTNFDPHGLLPESL DYWTYQAH*PPLLFWNV*PGL CSRNPSASAASRC*NSVNLTS MGRLNPKN*WWTTGAQLSH* RTGKSKLPS	210782; 210786; 210787; 210788; 210789; 210790; 210791	210792

LibC000227	CA2 (ак 2-259 ДТ, P13H, E117*, G150S, L184F, P185L, E186N, S187P, L188W, D189I, Y190T, W191G, T192P, Y193T, P194Q, G195A, S196H, L197*, T198P, T199P, P200L, P201L, L202F, L203W, E204N, C205V, V206*, T207P, W208G, I209L, V210C, L211*, K212R, E213N, I215S, S216A, V217S, S218A, S219A, E220S, Q221R, V222C, L223*, K224N, F225S, R226V, K227N, N229T, F230S, N231M, E233R, G234V, E235N, E237K, E238N, L239*, M240W, V241W, D242T, N243T, W244G, R245A, P246Q, A247L, Q248S, P249H, L250*, K251R, N252T, R253G, Q254K, I255S, A257L, S258P, F259S)	SHHWGYGKHNGHEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAA*LHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVSSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLFLNPWITGPTQAH*PPLLFWNV*PGLC*RNPSASAASRC*NSVNLTSMGRVNPKN*WWTTGAQLSH*RTGKSKLPS	210793; 210794; 210787; 210795; 210796; 210797; 210790; 210791	210798
LibC000218	CA2 (ак 2-260 ДТ, A133T, L147F, K148E, V149G, G150W, S151Q, A152R, K153*, P154T, L156P, Q157S, K158E, V159S, V160C, D161*, V162C, L163A, D164G, S165F, I166H, K167*, T168N, K171Q, S172E, A173C, D174*, F175L, T176H, N177*, F178L, D179R, P180S, R181S, G182W, L183P, L184P, P185S, E186*, S187I, L188P, D189G, Y190L, W191L, T192D, Y193L, G195R, S196L, L197T, T198D, T199H, P201S, L202S, L203S, E204G, C205M, V206C, T207D, W208L, I209D, V210C, L211A, K212Q, E213G, P214T, I215H, S216Q, V217R, S218Q, S219Q, E220R, Q221A, V222G, L223V, K224E, F225I, R226P, K227*, L228T, N229*, F230L, N231Q, G232W,	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKTVQQPDGLAVLGIFFEGWQR*TGPSESC*CAGFH*NKGQEC*LH*LRSSWPPS*IPGLLDLPRLTDHPSSSGMCDLDCAQGTHQRQQRAGVEIP*T*LQWGG*TRRTDGGQLAPSSATEEQANQSFLQ	210799; 210800; 210801; 210802; LH; 210803; 210804; T; 210805; 210806	210807

	E233G, E235*, P236T, E237R, E238R, L239T, M240D, V241G, D242G, N243Q, W244L, R245A, A247S, Q248S, P249A, L250T, K251E, N252E, R253Q, Q254A, I255N, K256Q, A257S, S258F, F259L, K260Q)			
LibC000216	CA2 (ак 2-260 ДТ, F20L, K45N, G104R, A116V, L147F, K148E, V149G, G150W, S151Q, A152R, K153*, P154T, L156P, Q157S, K158E, V159S, V160C, D161*, V162C, L163A, D164G, S165F, I166H, K167*, T168N, K171Q, S172E, A173C, D174*, F175L, T176H, N177*, F178L, D179R, P180S, R181S, G182W, L183P, L184P, P185S, E186*, S187I, L188P, D189G, Y190L, W191L, T192D, Y193L, G195R, S196L, L197T, T198D, T199H, P201S, L202S, L203S, E204G, C205M, V206C, T207D, W208L, I209D, V210C, L211A, K212Q, E213G, P214T, I215H, S216Q, V217R, S218Q, S219Q, E220R, Q221A, V222G, L223I, K224E, F225I, R226P, K227*, L228T, N229*, F230L, N231Q, G232W, E233G, E235*, P236T, E237R, E238R, L239T, M240D, V241G, D242G, N243Q, W244L, R245A, A247S, Q248S, P249A, L250T, K251E, N252E, R253Q, Q254A, I255N, K256Q, A257S, S258F, F259L, K260Q)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDLPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLNPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQRSEHTVDKKKYAVELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFFEGWQR*TGPSESC*CAGFH*NKGQEC*LH*LRSSWPPS*IPGLLDLPRLTDHPSSSGMCDLDCAQGTHQRQQRAGIEIP*T*LQWGG*TRRTDGGQLAPSSATEEQANQSFLQ	210808; 210800; 210801; 210802; LH; 210803; 210809; T; 210805; 210806	210810
LibC000222	CA2 (ак 2-259 ДТ, N11K, G12D, P13L, E14N, H15T, W16G, H17I, K18R, D19T, F20S, I22L, A23P,	SHHWGYGKHKDLNTGIRTSPLPRESASPLLTSTLIQPSMTLP*SPCLFPMIKQLP*GSSTMVMLST	210811; 21081	210819

	K24R, G25E, E26S, R27A, Q28S, S29P, P30L, V31L, D32T, I33S, D34T, T35L, H36I, T37Q, A38P, K39S, Y40M, D41T, P42L, S43P, L44*, K45S, L47C, S48L, V49F, S50P, Y51M, D52I, Q53K, A54Q, T55L, S56P, L57*, R58G, I59S, L60S, N61T, N62M, G63V, H64M, A65L, F66S, N67T, V68W, E69S, F70L, D71M, D72T, S73L, Q74R, D75T, A77Q, V78C, L79S, K80R, G81E, G82D, L84W, D85M, G86A, T87L, Y88T, R89D, L90*, I91F, Q92S, H94T, H96T, W97G, G98V, S99H, D101M, G102D, Q103K, G104V, S105Q, E106S, H107I, T108L, V109W, D110I, K112R, K113N, Y114M, A115L, A116Q, E117N, L118F, H119T, L120W, V121F, H122T, W123G, N124T, T125P, K126N, Y127M, D129I, F130L, A133L, V134C, Q135S, Q136N, P137L, D138M, G139D, L140W, A141P, V142F, L143*, G144V, I145F, L147*, K148R, V149L, G150A, S151A, A152L, K153N, P154R, G155A, L156F, Q157R, V159L, V160L, D161M, V162C, L163W, D164I, S165P, I166L, T168Q, K169R, G170A, K171R, S172V, A173L, D174T, F175S, T176L, N177T, F178S, D179I, P180L, R181V, G182A, L183S, L184F, P185V, E186N, S187P, L188W, D189I, Y190T, W191G, T192P, Y193T, P194Q, G195A, S196H, L197*, T198P, T199P, P200L, P201L, L202F, L203W, E204N, C205V, V206*, T207P, W208G, I209L,	WSLMTLRTKQCSREDPWMALTD*FSFTFTGVHLMDKVQSILWIKRNMLQNFTWFTGTPNMGILGKLCSNLMDWPF*VFF*RLAALNRAFRKLLMCWIPLKQRARVLTSLTSILVASFVNPWITGPTQAH*PPLLFWNV*PGLCSWNPSASAASRC*NYVNLTSMGRVNPKN*RWTTGALLSH*RTGKSKLPS	2; 210813; 210814; VFF; 210815; 210787; 210816; 210817; 210818; 210791;	

	V210C, L211S, K212W, E213N, I215S, S216A, V217S, S218A, S219A, E220S, Q221R, V222C, L223*, K224N, F225Y, R226V, K227N, N229T, F230S, N231M, E233R, G234V, E235N, E237K, E238N, L239*, M240R, V241W, D242T, N243T, W244G, R245A, P246L, A247L, Q248S, P249H, L250*, K251R, N252T, R253G, Q254K, I255S, A257L, S258P, F259S)			

[0073] Дополнительные дестабилизирующие домены CA2 представлены в Таблице 4. Дестабилизирующие мутантные CA2, представленные в Таблице 3B, идентифицированы, как описано выше, например, с помощью структурно-направленного мутагенеза или путем комбинирования отдельных мутантов.

Таблица 4: ДД CA2

Описание	**Аминокисл. последовательность**	**Аминокисл. SEQ ID NO.**	**Нуклеот. SEQ ID NO.**
CA2 (M1del, E106D) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDK AVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSDHTVDKKK YAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVG SAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210968	211004
CA2 (M1del, I59N, G102R) - вариант 2	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATSLRNLNNGHAFNVEFDDSQDK AVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDRQGSEHTVDKKK YAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVG SAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210969	211005
CA2 (M1del, L197P) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDK AVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKK YAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVG	210970	211006

	SAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSPTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK		
CA2 (M1del, L156H, S172C, F178Y, E186D) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDK AVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKK YAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVG SAKPGHQKVVDVLDSIKTKGKCADFTNYDPRGLLPDSL DYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRK LNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210971	211007
CA2 (M1del, L156H) - вариант 2	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDK AVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKK YAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVG SAKPGHQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210972	211008
CA2 (M1del, R27L, T87I, H122Y, N252D) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGELQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDK AVLKGGPLDGIYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVYWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKDRQIKASFK	210973	211009
CA2 (I59N) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATSLRNLNNGHAFNVEFDDSQDK AVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKK YAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVG SAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210974	211010
CA2 (G63D) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNDHAFNVEFDDSQDK AVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKK YAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVG SAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210975	211011

CA2 (M1del, H122Y) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDK AVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKK YAAELHLVYWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVG SAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210976	211012
CA2 (M1del, G63D, M240L) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNDHAFNVEFDDSQDK AVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKK YAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVG SAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEGEPEELLVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210977	211013
CA2 (M1del, A77I, P249F) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKI VLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEGEPEELMVDNWRPAQFLKNRQIKASFK	210978	211014
CA2 (M1del, D71K, T192F) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFKDSQDK AVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKK YAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVG SAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWFYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210979	211015
CA2 (M1del, L156H)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDK AVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKK YAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVG SAKPGHQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210980	211016
CA2 (M1del, R27L, H122Y) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGELQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDK AVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKK YAAELHLVYWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVG	210981	211017

	SAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK		
CA2 (M1del, T87I, H122Y) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDK AVLKGGPLDGIYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVYWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210982	211018
CA2 (M1del, H122Y, N252D) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDK AVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKK YAAELHLVYWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVG SAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKDRQIKASFK	210983	211019
CA2 (M1del, D72F, V241F) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDFSQDKA VLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEGEPEELMFDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210984	211020
CA2 (M1del, V241F, P249L) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDK AVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKK YAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVG SAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEGEPEELMFDNWRPAQLLKNRQIKASFK	210985	211021
CA2 (M1del, D72F, P249L) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDFSQDKA VLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEGEPEELMVDNWRPAQLLKNRQIKASFK	210986	211022

CA2 (M1del, D71L, T87N) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFLDSQDKA VLKGGPLDGNYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210987	211023
CA2 (M1del, D71L, L250R) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFLDSQDKA VLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEGEPEELMVDNWRPAQPRKNRQIKASFK	210988	211024
CA2 (Y51T) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSTDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKA VLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210989	211025
CA2 (S73N, R89F) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDNQDK AVLKGGPLDGTYFLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKK YAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVG SAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210990	211026
CA2 (D72F, P249F) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDFSQDKA VLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEGEPEELMVDNWRPAQFLKNRQIKASFK	210991	211027
CA2 (T55K, G63N, Q248N) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQAKSLRILNNNHAFNVEFDDSQDK AVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKK YAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVG	210992	211028

	SAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEGEPEELMVDNWRPANPLKNRQIKASFK		
CA2 (Y193I) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDK AVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKK YAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVG SAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTIPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210993	211029
CA2 (S56F) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATFLRILNNGHAFNVEFDDSQDK AVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKK YAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVG SAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210994	211030
CA2 (S56F, D71S) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATFLRILNNGHAFNVEFSDSQDKA VLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210995	211031
CA2 (S73N, R89Y) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDNQDK AVLKGGPLDGTYYLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKK YAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVG SAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210996	211032
CA2 (V134F, L228F) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDK AVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKK YAAELHLVHWNTKYGDFGKAFQQPDGLAVLGIFLKVG SAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKFN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210997	211033

CA2 (M1del, L156H, A256del, S257del, F258del, K259del) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDK AVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKK YAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVG SAKPGHQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIK	210998	211034
CA2 (M1del, S2del, H3del, H4del, W5del, L156H) - вариант 1	GYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPS LKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKG GPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAEL HLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPG HQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTY PGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGE GEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	210999	211035
CA2 (M1del, W5Y, L156H) - вариант 1	SHHYGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAK YDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKA VLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGHQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	211000	211036
CA2 (M1del, L156H, G234del, E235del, P236del) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDK AVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKK YAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVG SAKPGHQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	211001	211037
CA2 (M1del, L156H, F225L) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDK AVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKK YAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVG SAKPGHQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKLRKL NFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	211002	211038
CA2 (M1del, D71N, D75N, D101N,	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFNDSQNK AVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLNGQGSEHTVDKKK YAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVG	211003	211039

L156H) - вариант 1	SAKPGHQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK		

[0074] В некоторых вариантах осуществления область или часть CA2 ДТ может быть использована в качестве шаблона для генерации ДД CA2. В некоторых вариантах осуществления, ДД CA2 могут исключать лизин в положении 260 из SEQ ID NO: 11717. В некоторых аспектах, области CA2 могут включать те, которые описаны в Таблице 5, но не ограничиваться ими.

Таблица 5: Области CA2

Описание	**АМИНОКИСЛ. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ**	**Аминокисл. SEQ ID NO.**	**Нуклеот. SEQ ID NO.**
CA2 (ак 1-142 ДТ)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYD PSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPL DGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAV	210820	-
CA2 (ак 2-142 ДТ)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDP SLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPL DGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAV	210821	-
CA2 (ак 1-190 ДТ)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYD PSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPL DGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIK TKGKSADFTNFDPRGLLPESLDY	210822	-
CA2 (ак 2-190 ДТ)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDP SLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPL DGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIK TKGKSADFTNFDPRGLLPESLDY	210823	-
CA2 (ак 1-89 ДТ)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYD PSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPL DGTYR	210824	-
CA2 (ак 2-89 ДТ)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDP SLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPL DGTYR	210825	-

CA2 (ак 1-243 ДТ)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDN	210826	-
CA2 (ак 2-243 ДТ)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDN	210827	-
CA2 (ак 1-166 ДТ)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSI	210828	-
CA2 (ак 2-166 ДТ)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSI	210782	210829
CA2 (ак 1-116 ДТ)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAA	210830	-
CA2 (ак 2-116 ДТ)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAA	210831	-
CA2 (ак 1-152 ДТ)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSA	210832	-
CA2 (ак 2-152 ДТ)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSA	210833	-
CA2 (ак 1-43 ДТ)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPS	210834	-
CA2 (ак 2-43 ДТ)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPS	210835	-

[0075] Любая из областей CA2, описанных в настоящем документе, может быть использована для создания ДД CA2. В Таблице 6 приведены ДД, полученные из областей CA2.

Таблица 6: ДД CA2, полученные из областей CA2

Описание	**АМИНОКИСЛ. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ**	**Амин окисл. SEQ ID NO.**	**Нуклеот. SEQ ID NO.**
CA2 (ак 2-142 ДТ, G12E, A38V, A65V, G98V, S99H, D101M, G102D, Q103K, G104V, S105Q, E106S, H107I, T108L, V109W, D110I, K112R, K113N, Y114M, A115L, A116Q, E117N, L118F, H119T, L120W, V121F, H122T, W123G, N124T, T125P, K126N, Y127M, D129I, F130L, K132E, A133L, V134C, Q135S, Q136N, P137L, D138M, G139D, L140W, A141P, V142F)	SHHWGYGKHNEPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTVKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHVFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWVHLMDKVQSILWIKRNMLQNFTWFTGTPNMGILGELCSNLMDWPF	210762	210836
CA2 (ак 2-190 ДТ, F20L, K45N, G104R, A116V, A173G)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDLPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLNPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQRSEHTVDKKKYAVELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSGDFTNFDPRGLLPESLDY	210765	210837
CA2 (ак 2-190 ДТ, H17D, P30S, G81V, K132R, S151I, A152D, A173G)	SHHWGYGKHNGPEHWDKDFPIAKGERQSSVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKVGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGRAVQQPDGLAVLGIFLKVGIDKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSGDFTNFDPRGLLPESLDY	210768	210838
CA2 (ак 2-89 ДТ, I59N)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRNLNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYR	210771	210839

CA2 (ак 2-243 ДТ, T35I, Y114H, P154L, D161V, P200A, Q221R, F225L, E233D)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDIHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKHAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKLGLQKVVVVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTAPLLECVTWIVLKEPISVSSERVLKLRKLNFNGDGEPEELMVDN	210774	210840
CA2 (ак 2-189 ДТ, S105L, L140V, G155C)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGLEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGVAVLGIFLKVGSAKPCLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD	210777	210841
CA2 (ак 2-243 ДТ, T35I, Y114H, P154L, D161V, P200A, F225L, E233D)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDIHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKHAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKLGLQKVVVVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTAPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKLRKLNFNGDGEPEELMVDN	210780	210842
CA2 (ак 2-116 ДТ, P13H)	SHHWGYGKHNGHEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAA	210793	210843
CA2 (ак 2-152 ДТ, A133T, L147F, K148E, V149G, G150W, S151Q, A152R)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKTVQQPDGLAVLGIFFEGWQR	210799	210844
CA2 (ак 2-152 ДТ, F20L, K45N, G104R, A116V, L147F, K148E, V149G, G150W, S151Q, A152R)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDLPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLNPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQRSEHTVDKKKYAVELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFFEGWQR	210808	210845
CA2 (ак 2-43 ДТ, N11K, G12D, P13L, E14N, H15T, W16G, H17I, K18R,	SHHWGYGKHKDLNTGIRTSPLPRESASPLLTSTLIQPSMTLP	210811	210846

D19T, F20S, I22L, A23P, K24R, G25E, E26S, R27A, Q28S, S29P, P30L, V31L, D32T, I33S, D34T, T35L, H36I, T37Q, A38P, K39S, Y40M, D41T, P42L, S43P)			

[0076] В некоторых вариантах осуществления ДД, полученные из CA2, могут включать одну, две, три, четыре, пять или более мутаций, описанных в предыдущих таблицах.

[0077] В некоторых вариантах осуществления мутация может быть консервативной (с такими же физико-химическими свойствами, как аминокислота в месте мутации), полуконсервативной (например, отрицательно или положительно заряженная аминокислота) или неконсервативной (аминокислота с другими физико-химическими свойствами, чем аминокислота в месте мутации). В некоторых вариантах осуществления аминокислота лизин может быть мутирована в глутаминовую кислоту или аргинин; аминокислота фенилаланин может быть мутирована в лейцин; аминокислота лейцин может быть мутирована в фенилаланин; или аминокислота аспарагин может быть мутирована в серин. Области, части или домены белков дикого типа могут быть использованы в качестве SRE/ДД полностью или частично. Они могут быть объединены или перегруппированы для создания новых пептидов, белков, областей или доменов, любой из которых может быть использован в качестве SRE/ДД или отправной точки для разработки дальнейших SRE и/или ДД.

[0078] Дестабилизирующие домены, описанные в настоящем документе, могут также включать аминокислотные и нуклеотидные замены, которые не влияют на стабильность, включая консервативные, неконсервативные замены и/или полиморфизмы. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе ДД CA2 могут также представлять собой фрагменты вышеуказанных дестабилизирующих доменов, включая фрагменты, содержащие вариантные аминокислотные последовательности. Предпочтительные фрагменты нестабильны в отсутствие стимула и стабилизируются при добавлении стимула. Предпочтительные фрагменты сохраняют способность взаимодействовать со стимулом с такой же эффективностью, как и описанные в данном документе ДД.

[0079] В одном варианте осуществления SRE содержит область белка CA2. Область белка CA2 может составлять 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260 или

более 260 аминокислот в длину. Область родительского белка может составлять 5-50, 25-75, 50-100, 75-125, 100-150, 125-175, 150-200, 175-225, 200-250, 225-260 аминокислот в длину.

[0080] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе ДД CA2 могут включать одну или более мутаций, которые относятся к Uniprot ID: P00918 (SEQ ID NO: 11717). Эти мутации могут включать A115L, A116Q, A116V, A133L, A133T, A141P, A152D, A152L, A152R, A173C, A173G, A173L, A173T, A23P, A247L, A247S, A257L, A257S, A38P, A38V, A54Q, A54V, A54X, A65L, A65N, A65V, A77I, A77P, A77Q, C205M, C205R, C205V, C205W, C205Y, D101G, D101M, D110I, D129I, D138G, D138M, D138N, D161*, D161M, D161V, D164G, D164I, D174*, D174T, D179E, D179I, D179R, D189G, D189I, D19T, D19V, D242G, D242T, D32T, D34T, D41T, D52I, D52L, D71F, D71G, D71K, D71M, D71S, D71Y, D72I, D72S, D72T, D72X, D75T, D75V, D85M, E106D, E106G, E106S, E117*, E117N, E14N, E186*, E186N, E204A, E204D, E204G, E204N, E213*, E213G, E213N, E220K, E220R, E220S, E233D, E233G, E233R, E235*, E235G, E235N, E237K, E237R, E238*, E238N, E238R, E26S, E69D, E69K, E69S, F130L, F146V, F175I, F175L, F175S, F178L, F178S, F20L, F20S, F225I, F225L, F225S, F225Y, F230I, F230L, F230S, F259L, F259S, F66S, F70I, F70L, F95Y, G102D, G104R, G104V, G128R, G12D, G12E, G131E, G131R, G131W, G139D, G144D, G144V, G150A, G150S, G150W, G155A, G155C, G155D, G155S, G170A, G170D, G182A, G182W, G195A, G195R, G232R, G232W, G234L, G234V, G25E, G63D, G63V, G81E, G81V, G82D, G86A, G86D, G98V, H107I, H107Q, H119T, H119Y, H122T, H122Y, H15L, H15T, H15Y, H17D, H17I, H36I, H36Q, H64M, H94T, H96T, I145F, I145M, I166H, I166L, I209D, I209L, I215H, I215S, I22L, I255N, I255S, I33S, I59F, I59N, I59S, I91F, K111E, K111N, K112R, K113I, K113N, K126N, K132E, K132R, K148E, K148R, K153*, K153N, K158E, K158N, K167*, K169N, K169R, K171Q, K171R, K18R, K212N, K212Q, K212R, K212W, K224E, K224N, K227*, K227N, K24R, K251E, K251R, K256Q, K260F, K260L, K260Q, K39S, K45N, K45S, K80M, K80R, L118F, L120W, L140V, L140W, L143*, L147*, L147F, L156F, L156H, L156P, L156Q, L163A, L163W, L183P, L183S, L184F, L184P, L188P, L188W, L197*, L197M, L197P, L197R, L197T, L202F, L202H, L202I, L202P, L202R, L202S, L203P, L203S, L203W, L211*, L211A, L211S, L223*, L223I, L223V, L228F, L228H, L228T, L239*, L239F, L239T, L250*, L250P, L250T, L44*, L44M, L47C, L47V, L57*, L57X, L60S, L79F, L79S, L84W, L90*, L90V, M240D, M240L, M240R, M240W, N11D, N11K, N124T, N177*, N177T, N229*, N229T, N231D, N231F, N231K, N231L, N231M, N231Q, N231T, N243Q, N243T, N252E, N252T, N61R, N61T, N61Y, N62K, N62M, N67D, N67T, P137L, P13A, P13H, P13L, P13S, P154L, P154R, P154T, P180L, P180S, P185L, P185S, P185V, P194Q, P200A, P200L, P200S, P200T, P201A, P201L, P201R, P201S, P214T, P236L, P236T, P246L, P246Q, P249A, P249F, P249H, P249I, P249X, P30L, P30S, P42L, P83A, Q103K, Q135S, Q136N, Q157R, Q157S, Q221A, Q221R, Q248F, Q248L, Q248S, Q254A, Q254K, Q28S, Q53H, Q53K, Q53N, Q74R, Q92H, Q92S, R181H, R181S, R181V, R226H, R226P, R226V, R245A, R253G, R253Q, R27A, R58G, R89D, R89F, R89I, R89X, R89Y, S105L, S105Q, S151A, S151I, S151Q, S165F, S165P, S172E, S172V, S187I, S187P, S196H, S196L, S216A, S216Q, S218A, S218Q, S219A, S219Q, S258F, S258P, S29C, S29P, S43P, S43T, S48L, S50P, S56F, S56N, S56P, S56X, S73L, S73N, S73X, S99H, T108L, T125I, T125P, T168K, T168N, T168Q, T176H, T176L, T192D, T192F, T192I, T192N, T192P, T192X, T198D, T198I, T198P, T199A, T199H, T199P, T207D, T207I, T207P, T207S, T35I, T35L, T37Q, T55L, T87L, V109M, V109W, V121F, V134C, V134F, V142F, V149G, V149L, V159L, V159S, V160C, V160L, V162A, V162C, V206*, V206C, V206M, V210C, V217L, V217R, V217S, V222A, V222C, V222G, V241G, V241W, V241X, V31L, V49F, V68L, V68W, V78C, W123G, W123R, W16G, W191*, W191G, W191L, W208G, W208L, W208S, W244*, W244G, W244L, W97C, W97G, Y114H, Y114M, Y127M, Y190*, Y190L, Y190T, Y193C, Y193F, Y193I, Y193L, Y193T, Y193V, Y193X, Y40M, Y51F, Y51M, Y51T, Y51X, Y88T, K9N,

S29A, но не ограничиваются ими. Как используется в настоящем документе, «*» обозначает трансляцию стоп-кодона, а X обозначает любую аминокислоту.

[0081] В одном варианте осуществления, описанный в данном документе ДД CA2 содержит мутацию, относящуюся к Uniprot ID: P00918 (SEQ ID NO: 11717), выбранную из E106D, G63D, H122Y, I59N, L156H, L183S, L197P, S56F, S56N, W208S, Y193I и Y51T.

[0082] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе ДД CA2 могут включать мутации, которые относятся к Uniprot ID: P00918 (SEQ ID NO: 11717). Эти мутации могут включать без ограничения CA2 (ак 2-260 ДТ, R27L, H122Y), CA2 (ак 2-260 ДТ, T87I, H122Y), CA2 (ак 2-260 ДТ, H122Y, N252D), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, V241F), CA2 (ак 2-260 ДТ, V241F, P249L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71L, L250R), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249F), CA2 (ак 2-260 ДТ, T55K, G63N, Q248N), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, A257del, S258del, F259del, K260del), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, S2del, H3del, H4del, W5del), CA2 (ак 2-260 ДТ, W4Y, L156H), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, G234del, E235del, P236del), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, F225L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D70N, D74N, D100N, L156H), (CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, G102R)(SEQ ID NO: 210598), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, E69V, N231I)(SEQ ID NO. 210748), CA2 (ак 2-260 ДТ, R27L, T87I, H122Y, N252D)(SEQ ID NO. 210702), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, V241F, P249L)(SEQ ID NO. 210503), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71L, T87N, L250R)(SEQ ID NO. 210510), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, S172C, F178Y, E186D)(SEQ ID NO. 210756), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71F, N231F)(SEQ ID NO. 210505), CA2 (ак 2-260 ДТ, A77I, P249F)(SEQ ID NO. 210514), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, P249H)(SEQ ID NO. 210516), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249H)(SEQ ID NO. 210518), CA2 (ак 2-260 ДТ, Q53N, N61Y)(SEQ ID NO. 210521), CA2 (ак 2-260 ДТ, E106D, C205S)(SEQ ID NO. 210523), CA2 (ак 2-260 ДТ, C205S, W208S)(SEQ ID NO. 210525), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73N, R89Y)(SEQ ID NO. 210532), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, T192F)(SEQ ID NO. 210534), CA2 (ак 2-260 ДТ, Y193L, K260L)(SEQ ID NO. 210540), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71F, V241F, P249L)(SEQ ID NO. 210544), CA2 (ак 2-260 ДТ, L147F, Q248F)(SEQ ID NO. 210548), CA2 (ак 2-260 ДТ, D52I, S258P)(SEQ ID NO. 210550), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72S, T192N)(SEQ ID NO. 210552), CA2 (ак 2-260 ДТ, D179E, T192I)(SEQ ID NO. 210554), CA2 (ак 2-260 ДТ, S56N, Q103K)(SEQ ID NO. 210558), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71Y, Q248L)(SEQ ID NO. 210560), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73N, R89F)(SEQ ID NO. 210562), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, N231L, E235G, L239F)(SEQ ID NO. 210564), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249I)(SEQ ID NO. 210568), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72X, V241X, P249X)(SEQ ID NO. 210572), CA2 (ак 2-260 ДТ, A54X, S56X, L57X, T192X)(SEQ ID NO. 210574), CA2 (ак 2-260 ДТ, Y193V, K260F)(SEQ ID NO. 210576), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, M240L)(SEQ ID NO. 210578), CA2 (ак 2-260 ДТ, V134F, L228F)(SEQ ID NO. 210580), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71G, N231K)(SEQ ID NO. 210582), CA2 (ак 2-260 ДТ, S56F, D71S)(SEQ ID NO. 210584), CA2 (ак 2-260 ДТ, D52L, G128R, Q248F)(SEQ ID NO. 210586), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73X, R89X)(SEQ ID NO. 210588), CA2 (ак 2-260 ДТ, Y51X, D72X, V241X, P249X)(SEQ ID NO. 210592), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72I, W97C)(SEQ ID NO. 210594), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, T192F, N231F)(SEQ ID NO. 210596), CA2 (ак 2-260 ДТ, H36Q, S43T, Y51F, N67D, G131W, R226H)(SEQ ID NO. 210698), CA2 (ак 2-260 ДТ, F70I, F146V)(SEQ ID NO. 210700), CA2 (ак 2-260 ДТ, K45N, V68L, H119Y, K169R, D179E)(SEQ ID NO. 210704), CA2 (ак 2-260 ДТ, H15L, A54V, K111E, E220K, F225I)(SEQ ID NO. 210706), CA2 (ак 2-260 ДТ, P13S, P83A, D101G, K111N, F230I)(SEQ ID NO. 210708), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, W123R, E220K)(SEQ ID NO. 210712), CA2 (ак 2-260 ДТ, N11D, E69K, G86D, V109M, K113I, T125I, D138G, G155S)(SEQ ID NO. 210714), CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, G102R, A173T)(SEQ ID NO. 210716), CA2 (ак 2-260 ДТ, L79F, P180S)(SEQ ID NO. 210718), CA2 (ак 2-260 ДТ, A77P, G102R, D138N)(SEQ ID NO. 210724), CA2 (ак 2-260 ДТ, F20L, K45N, G63D, E69V,

N231I)(SEQ ID NO. 210726), CA2 (ак 2-260 ДТ, T199N, L202P, L228F)(SEQ ID NO. 210728), CA2 (ак 2-260 ДТ, K9N, H122Y, T168K)(SEQ ID NO. 210730), CA2 (ак 2-260 ДТ, Q53H, L90V, Q92H, G131E)(SEQ ID NO. 210732), CA2 (ак 2-260 ДТ, L44M, L47V, N62K, E69D)(SEQ ID NO. 210734), CA2 (ак 2-260 ДТ, D75V, K169N, F259L)(SEQ ID NO. 210738), CA2 (ак 2-260 ДТ, T207S, V222A, N231D)(SEQ ID NO. 210740), CA2 (ак 2-260 ДТ, I59F, V206M, G232R)(SEQ ID NO. 210742), CA2 (ак 2-260 ДТ, P13A, A133T)(SEQ ID NO. 210744), CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, R89I)(SEQ ID NO. 210750), CA2 (ак 2-260 ДТ, A65N, G86D, G131R, G155D, K158N, V162A, G170D, P236L)(SEQ ID NO. 210752), CA2 (ак 2-260 ДТ, G12R, H15Y, D19V)(SEQ ID NO. 210754), CA2 (ак 2-260 ДТ, A65V, F95Y, E106G, H107Q, I145M, F175I)(SEQ ID NO. 210758) и/или CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, E69V, N231I)(SEQ ID NO. 210851 или 210847).

[0083] В одном варианте осуществления, описанный в данном документе ДД CA2 содержит множество мутаций, которые относятся к Uniprot ID: P00918 (SEQ ID NO: 11717), выбранные из CA2 (ак 2-260 ДТ, R27L, H122Y), CA2 (ак 2-260 ДТ, T87I, H122Y), CA2 (ак 2-260 ДТ, H122Y, N252D), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, V241F), CA2 (ак 2-260 ДТ, V241F, P249L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71L, L250R), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249F), CA2 (ак 2-260 ДТ, T55K, G63N, Q248N), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, A257del, S258del, F259del, K260del), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, S2del, H3del, H4del, W5del), CA2 (ак 2-260 ДТ, W4Y, L156H), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, G234del, E235del, P236del), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, F225L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D70N, D74N, D100N, L156H), (CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, G102R)(SEQ ID NO: 210598), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, E69V, N231I)(SEQ ID NO. 210748), CA2 (ак 2-260 ДТ, R27L, T87I, H122Y, N252D)(SEQ ID NO. 210702), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, V241F, P249L)(SEQ ID NO. 210503), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71L, T87N, L250R)(SEQ ID NO. 210510), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, S172C, F178Y, E186D)(SEQ ID NO. 210756), CA2 (ак 2-260 ДТ, A77I, P249F)(SEQ ID NO. 210514), CA2 (ак 2-260 ДТ, E106D, C205S)(SEQ ID NO. 210523), CA2 (ак 2-260 ДТ, C205S, W208S)(SEQ ID NO. 210525), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73N, R89Y)(SEQ ID NO. 210532), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, T192F)(SEQ ID NO. 210534), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73N, R89F)(SEQ ID NO. 210562), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, M240L)(SEQ ID NO. 210578), CA2 (ак 2-260 ДТ, V134F, L228F)(SEQ ID NO. 210580) и/или CA2 (ак 2-260 ДТ, S56F, D71S)(SEQ ID NO. 210584).

[0084]

[0085] В некоторых вариантах осуществления CA2 может быть получен из карбоангидраз Homo sapiens. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе ДД CA2 могут иметь по меньшей мере 40 %, 45 %, 50 %, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, но менее 100% идентичности последовательности с конкретным эталонным полинуклеотидом или полипептидом, как определено с помощью программ и параметров выравнивания последовательности, описанных в настоящем документе и известных специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления эталонный полипептид может представлять собой SEQ ID NO: 11717. Инструменты для выравнивания могут включать инструменты из набора BLAST (Stephen F. Altschul, et al. (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402).

[0086] В некоторых вариантах осуществления ДД CA2 могут быть получены из карбоангидраз видов, отличных от Homo sapiens. В некоторых вариантах осуществления ДД CA2 могут быть получены из карбоангидраз таких видов, как Acinonyx jubatus, Ailuropoda melanoleuca, Balaenoptera acutorostrata scammoni, Callithrix jacchus, Callorhinus ursinus, Camelus bactrianus, Camelus dromedarius, Camelus ferus, Canis lupus dingo,

Canis lupus familiaris, Carlito syrichta, Castor canadensis, Cebus capucinus imitator, Ceratotherium simum, Cercocebus atys, Chinchilla lanigera, Chlorocebus sabaeus, Colobus angolensis palliatus, Delphinapterus leucas, Dipodomys ordii, Enhydra lutris kenyoni, Equus asinus, Equus caballus, Equus przewalskii, Erinaceus europaeus, Eumetopias jubatus, Felis catus, Galeopterus variegatus, Gorilla, Homo sapiens, Ictidomys tridecemlineatus, Jaculus, Lagenorhynchus obliquidens, Lemur catta, Leptonychotes weddellii, Lipotes vexillifer, Loxodonta africana, Macaca fascicularis, Macaca mulatta, Macaca nemestrina, Mandrillus leucophaeus, Manis javanica, Marmota flaviventris, Marmota, Microcebus murinus, Mus caroli, Mus musculus, Mus pahari, Mustela putorius furo, Nannospalax galili, Neomonachus schauinslandi, Neophocaena asiaeorientalis, Nomascus leucogenys, Odobenus rosmarus divergens, Orcinus orca, Oryctolagus cuniculus, Otolemur garnettii, Pan paniscus, Pan troglodytes, Panthera pardus, Panthera tigris altaica, Papio anubis, Physeter catodon, Piliocolobus tephrosceles, Pongo abelii, Propithecus coquereli, Puma concolor, Rhinopithecus bieti, Rhinopithecus roxellana, Saimiri boliviensis, Sus scrofa, Theropithecus gelada, Trichechus manatus latirostris, Tupaia chinensis, Tursiops truncatus, Urocitellus parryii, Ursus arctos horribilis, Ursus maritimus, Vulpes и/или Zalophus californianus, но не ограничиваясь ими.

[0087] SRE, описанные в настоящем документе, могут включать ДД CA2, которые включают одну, две, три или более мутаций, таких как A115L, A116Q, A116V, A133L, A133T, A141P, A152D, A152L, A152R, A173C, A173G, A173L, A173T, A23P, A247L, A247S, A257L, A257S, A38P, A38V, A54Q, A54V, A54X, A65L, A65N, A65V, A77I, A77P, A77Q, C205M, C205R, C205V, C205W, C205Y, D101G, D101M, D110I, D129I, D138G, D138M, D138N, D161*, D161M, D161V, D164G, D164I, D174*, D174T, D179E, D179I, D179R, D189G, D189I, D19T, D19V, D242G, D242T, D32T, D34T, D41T, D52I, D52L, D71F, D71G, D71K, D71M, D71S, D71Y, D72I, D72S, D72T, D72X, D75T, D75V, D85M, E106D, E106G, E106S, E117*, E117N, E14N, E186*, E186N, E204A, E204D, E204G, E204N, E213*, E213G, E213N, E220K, E220R, E220S, E233D, E233G, E233R, E235*, E235G, E235N, E237K, E237R, E238*, E238N, E238R, E26S, E69D, E69K, E69S, F130L, F146V, F175I, F175L, F175S, F178L, F178S, F20L, F20S, F225I, F225L, F225S, F225Y, F230I, F230L, F230S, F259L, F259S, F66S, F70I, F70L, F95Y, G102D, G104R, G104V, G128R, G12D, G12E, G131E, G131R, G131W, G139D, G144D, G144V, G150A, G150S, G150W, G155A, G155C, G155D, G155S, G170A, G170D, G182A, G182W, G195A, G195R, G232R, G232W, G234L, G234V, G25E, G63D, G63V, G81E, G81V, G82D, G86A, G86D, G98V, H107I, H107Q, H119T, H119Y, H122T, H122Y, H15L, H15T, H15Y, H17D, H17I, H36I, H36Q, H64M, H94T, H96T, I145F, I145M, I166H, I166L, I209D, I209L, I215H, I215S, I22L, I255N, I255S, I33S, I59F, I59N, I59S, I91F, K111E, K111N, K112R, K113I, K113N, K126N, K132E, K132R, K148E, K148R, K153*, K153N, K158E, K158N, K167*, K169N, K169R, K171Q, K171R, K18R, K212N, K212Q, K212R, K212W, K224E, K224N, K227*, K227N, K24R, K251E, K251R, K256Q, K260F, K260L, K260Q, K39S, K45N, K45S, K80M, K80R, L118F, L120W, L140V, L140W, L143*, L147*, L147F, L156F, L156H, L156P, L156Q, L163A, L163W, L183P, L183S, L184F, L184P, L188P, L188W, L197*, L197M, L197P, L197R, L197T, L202F, L202H, L202I, L202P, L202R, L202S, L203P, L203S, L203W, L211*, L211A, L211S, L223*, L223I, L223V, L228F, L228H, L228T, L239*, L239F, L239T, L250*, L250P, L250T, L44*, L44M, L47C, L47V, L57*, L57X, L60S, L79F, L79S, L84W, L90*, L90V, M240D, M240L, M240R, M240W, N11D, N11K, N124T, N177*, N177T, N229*, N229T, N231D, N231F, N231K, N231L, N231M, N231Q, N231T, N243Q, N243T, N252E, N252T, N61R, N61T, N61Y, N62K, N62M, N67D, N67T, P137L, P13A, P13H, P13L, P13S, P154L, P154R, P154T, P180L, P180S, P185L, P185S, P185V, P194Q, P200A, P200L, P200S, P200T, P201A, P201L, P201R, P201S, P214T, P236L, P236T, P246L, P246Q, P249A, P249F, P249H, P249I, P249X, P30L, P30S, P42L, P83A, Q103K, Q135S, Q136N, Q157R, Q157S, Q221A, Q221R, Q248F, Q248L, Q248S,

Q254A, Q254K, Q28S, Q53H, Q53K, Q53N, Q74R, Q92H, Q92S, R181H, R181S, R181V, R226H, R226P, R226V, R245A, R253G, R253Q, R27A, R58G, R89D, R89F, R89I, R89X, R89Y, S105L, S105Q, S151A, S151I, S151Q, S165F, S165P, S172E, S172V, S187I, S187P, S196H, S196L, S216A, S216Q, S218A, S218Q, S219A, S219Q, S258F, S258P, S29C, S29P, S43P, S43T, S48L, S50P, S56F, S56N, S56P, S56X, S73L, S73N, S73X, S99H, T108L, T125I, T125P, T168K, T168N, T168Q, T176H, T176L, T192D, T192F, T192I, T192N, T192P, T192X, T198D, T198I, T198P, T199A, T199H, T199P, T207D, T207I, T207P, T207S, T35I, T35L, T37Q, T55L, T87L, V109M, V109W, V121F, V134C, V134F, V142F, V149G, V149L, V159L, V159S, V160C, V160L, V162A, V162C, V206*, V206C, V206M, V210C, V217L, V217R, V217S, V222A, V222C, V222G, V241G, V241W, V241X, V31L, V49F, V68L, V68W, V78C, W123G, W123R, W16G, W191*, W191G, W191L, W208G, W208L, W208S, W244*, W244G, W244L, W97C, W97G, Y114H, Y114M, Y127M, Y190*, Y190L, Y190T, Y193C, Y193F, Y193I, Y193L, Y193T, Y193V, Y193X, Y40M, Y51F, Y51M, Y51T, Y51X, Y88T, K9N, S29A, но не ограничиваются ими.

[0088] В одном варианте осуществления, SRE, описанный в настоящем документе, может включать ДД CA2, который включает мутацию, выбранную из E106D, G63D, H122Y, I59N, L156H, L183S, L197P, S56F, S56N, W208S, Y193I и Y51T.

[0089] SRE, описанные в настоящем документе, могут включать ДД CA2, которые включают мутации, такие как, без ограничения, CA2 (ак 2-260 ДТ, R27L, H122Y), CA2 (ак 2-260 ДТ, T87I, H122Y), CA2 (ак 2-260 ДТ, H122Y, N252D), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, V241F), CA2 (ак 2-260 ДТ, V241F, P249L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71L, L250R), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249F), CA2 (ак 2-260 ДТ, T55K, G63N, Q248N), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, A257del, S258del, F259del, K260del), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, S2del, H3del, H4del, W5del), CA2 (ак 2-260 ДТ, W4Y, L156H), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, G234del, E235del, P236del), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, F225L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D70N, D74N, D100N, L156H), (CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, G102R)(SEQ ID NO: 210598), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, E69V, N231I)(SEQ ID NO. 210748), CA2 (ак 2-260 ДТ, R27L, T87I, H122Y, N252D)(SEQ ID NO. 210702), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, V241F, P249L)(SEQ ID NO. 210503), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71L, T87N, L250R)(SEQ ID NO. 210510), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, S172C, F178Y, E186D)(SEQ ID NO. 210756), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71F, N231F)(SEQ ID NO. 210505), CA2 (ак 2-260 ДТ, A77I, P249F)(SEQ ID NO. 210514), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, P249H)(SEQ ID NO. 210516), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249H)(SEQ ID NO. 210518), CA2 (ак 2-260 ДТ, Q53N, N61Y)(SEQ ID NO. 210521), CA2 (ак 2-260 ДТ, E106D, C205S)(SEQ ID NO. 210523), CA2 (ак 2-260 ДТ, C205S, W208S)(SEQ ID NO. 210525), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73N, R89Y)(SEQ ID NO. 210532), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, T192F)(SEQ ID NO. 210534), CA2 (ак 2-260 ДТ, Y193L, K260L)(SEQ ID NO. 210540), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71F, V241F, P249L)(SEQ ID NO. 210544), CA2 (ак 2-260 ДТ, L147F, Q248F)(SEQ ID NO. 210548), CA2 (ак 2-260 ДТ, D52I, S258P)(SEQ ID NO. 210550), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72S, T192N)(SEQ ID NO. 210552), CA2 (ак 2-260 ДТ, D179E, T192I)(SEQ ID NO. 210554), CA2 (ак 2-260 ДТ, S56N, Q103K)(SEQ ID NO. 210558), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71Y, Q248L)(SEQ ID NO. 210560), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73N, R89F)(SEQ ID NO. 210562), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, N231L, E235G, L239F)(SEQ ID NO. 210564), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249I)(SEQ ID NO. 210568), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72X, V241X, P249X)(SEQ ID NO. 210572), CA2 (ак 2-260 ДТ, A54X, S56X, L57X, T192X)(SEQ ID NO. 210574), CA2 (ак 2-260 ДТ, Y193V, K260F)(SEQ ID NO. 210576), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, M240L)(SEQ ID NO. 210578), CA2 (ак 2-260 ДТ, V134F, L228F)(SEQ ID NO. 210580), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71G, N231K)(SEQ ID NO. 210582), CA2 (ак 2-260 ДТ, S56F, D71S)(SEQ ID NO. 210584), CA2 (ак 2-260 ДТ, D52L, G128R, Q248F)(SEQ ID NO. 210586), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73X, R89X)(SEQ ID NO. 210588), CA2 (ак 2-260 ДТ, Y51X, D72X, V241X, P249X)(SEQ ID NO. 210592), CA2 (ак 2-

260 ДТ, D72I, W97C)(SEQ ID NO. 210594), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, T192F, N231F)(SEQ ID NO. 210596), CA2 (ак 2-260 ДТ, H36Q, S43T, Y51F, N67D, G131W, R226H)(SEQ ID NO. 210698), CA2 (ак 2-260 ДТ, F70I, F146V)(SEQ ID NO. 210700), CA2 (ак 2-260 ДТ, K45N, V68L, H119Y, K169R, D179E)(SEQ ID NO. 210704), CA2 (ак 2-260 ДТ, H15L, A54V, K111E, E220K, F225I)(SEQ ID NO. 210706), CA2 (ак 2-260 ДТ, P13S, P83A, D101G, K111N, F230I)(SEQ ID NO. 210708), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, W123R, E220K)(SEQ ID NO. 210712), CA2 (ак 2-260 ДТ, N11D, E69K, G86D, V109M, K113I, T125I, D138G, G155S)(SEQ ID NO. 210714), CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, G102R, A173T)(SEQ ID NO. 210716), CA2 (ак 2-260 ДТ, L79F, P180S)(SEQ ID NO. 210718), CA2 (ак 2-260 ДТ, A77P, G102R, D138N)(SEQ ID NO. 210724), CA2 (ак 2-260 ДТ, F20L, K45N, G63D, E69V, N231I)(SEQ ID NO. 210726), CA2 (ак 2-260 ДТ, T199N, L202P, L228F)(SEQ ID NO. 210728), CA2 (ак 2-260 ДТ, K9N, H122Y, T168K)(SEQ ID NO. 210730), CA2 (ак 2-260 ДТ, Q53H, L90V, Q92H, G131E)(SEQ ID NO. 210732), CA2 (ак 2-260 ДТ, L44M, L47V, N62K, E69D)(SEQ ID NO. 210734), CA2 (ак 2-260 ДТ, D75V, K169N, F259L)(SEQ ID NO. 210738), CA2 (ак 2-260 ДТ, T207S, V222A, N231D)(SEQ ID NO. 210740), CA2 (ак 2-260 ДТ, I59F, V206M, G232R)(SEQ ID NO. 210742), CA2 (ак 2-260 ДТ, P13A, A133T)(SEQ ID NO. 210744), CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, R89I)(SEQ ID NO. 210750), CA2 (ак 2-260 ДТ, A65N, G86D, G131R, G155D, K158N, V162A, G170D, P236L)(SEQ ID NO. 210752), CA2 (ак 2-260 ДТ, G12R, H15Y, D19V)(SEQ ID NO. 210754), CA2 (ак 2-260 ДТ, A65V, F95Y, E106G, H107Q, I145M, F175I)(SEQ ID NO. 210758) и/или CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, E69V, N231I)(SEQ ID NO. 210851 или 210847).

[0090] В одном варианте осуществления, SRE, описанный в настоящем документе, может включать ДД CA2, который включает мутации, выбранные из CA2 (ак 2-260 ДТ, R27L, H122Y), CA2 (ак 2-260 ДТ, T87I, H122Y), CA2 (ак 2-260 ДТ, H122Y, N252D), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, V241F), CA2 (ак 2-260 ДТ, V241F, P249L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71L, L250R), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249F), CA2 (ак 2-260 ДТ, T55K, G63N, Q248N), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, A257del, S258del, F259del, K260del), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, S2del, H3del, H4del, W5del), CA2 (ак 2-260 ДТ, W4Y, L156H), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, G234del, E235del, P236del), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, F225L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D70N, D74N, D100N, L156H), (CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, G102R)(SEQ ID NO: 210598), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, E69V, N231I)(SEQ ID NO. 210748), CA2 (ак 2-260 ДТ, R27L, T87I, H122Y, N252D)(SEQ ID NO. 210702), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, V241F, P249L)(SEQ ID NO. 210503), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71L, T87N, L250R)(SEQ ID NO. 210510), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, S172C, F178Y, E186D)(SEQ ID NO. 210756), CA2 (ак 2-260 ДТ, A77I, P249F)(SEQ ID NO. 210514), CA2 (ак 2-260 ДТ, E106D, C205S)(SEQ ID NO. 210523), CA2 (ак 2-260 ДТ, C205S, W208S)(SEQ ID NO. 210525), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73N, R89Y)(SEQ ID NO. 210532), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, T192F)(SEQ ID NO. 210534), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73N, R89F)(SEQ ID NO. 210562), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, M240L)(SEQ ID NO. 210578), CA2 (ак 2-260 ДТ, V134F, L228F)(SEQ ID NO. 210580) и/или CA2 (ак 2-260 ДТ, S56F, D71S)(SEQ ID NO. 210584).

[0091] Также в настоящем документе предложены системы биоциклов, которые включают по меньшей мере один эффекторный модуль. Эффекторный модуль биоцикла может включать элемент ответа на стимул (SRE), который полностью или частично включает карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717). Биоциклы могут также включать по меньшей мере одну полезную нагрузку, которая может быть прикреплена, добавлена или связана с SRE.

[0092] SRE системы биоцикла, которая включает полностью или частично карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717), может включать одну, две, три или более мутаций, таких как A115L, A116Q, A116V,

A133L, A133T, A141P, A152D, A152L, A152R, A173C, A173G, A173L, A173T, A23P, A247L, A247S, A257L, A257S, A38P, A38V, A54Q, A54V, A54X, A65L, A65N, A65V, A77I, A77P, A77Q, C205M, C205R, C205V, C205W, C205Y, D101G, D101M, D110I, D129I, D138G, D138M, D138N, D161*, D161M, D161V, D164G, D164I, D174*, D174T, D179E, D179I, D179R, D189G, D189I, D19T, D19V, D242G, D242T, D32T, D34T, D41T, D52I, D52L, D71F, D71G, D71K, D71M, D71S, D71Y, D72I, D72S, D72T, D72X, D75T, D75V, D85M, E106D, E106G, E106S, E117*, E117N, E14N, E186*, E186N, E204A, E204D, E204G, E204N, E213*, E213G, E213N, E220K, E220R, E220S, E233D, E233G, E233R, E235*, E235G, E235N, E237K, E237R, E238*, E238N, E238R, E26S, E69D, E69K, E69S, F130L, F146V, F175I, F175L, F175S, F178L, F178S, F20L, F20S, F225I, F225L, F225S, F225Y, F230I, F230L, F230S, F259L, F259S, F66S, F70I, F70L, F95Y, G102D, G104R, G104V, G128R, G12D, G12E, G131E, G131R, G131W, G139D, G144D, G144V, G150A, G150S, G150W, G155A, G155C, G155D, G155S, G170A, G170D, G182A, G182W, G195A, G195R, G232R, G232W, G234L, G234V, G25E, G63D, G63V, G81E, G81V, G82D, G86A, G86D, G98V, H107I, H107Q, H119T, H119Y, H122T, H122Y, H15L, H15T, H15Y, H17D, H17I, H36I, H36Q, H64M, H94T, H96T, I145F, I145M, I166H, I166L, I209D, I209L, I215H, I215S, I22L, I255N, I255S, I33S, I59F, I59N, I59S, I91F, K111E, K111N, K112R, K113I, K113N, K126N, K132E, K132R, K148E, K148R, K153*, K153N, K158E, K158N, K167*, K169N, K169R, K171Q, K171R, K18R, K212N, K212Q, K212R, K212W, K224E, K224N, K227*, K227N, K24R, K251E, K251R, K256Q, K260F, K260L, K260Q, K39S, K45N, K45S, K80M, K80R, L118F, L120W, L140V, L140W, L143*, L147*, L147F, L156F, L156H, L156P, L156Q, L163A, L163W, L183P, L183S, L184F, L184P, L188P, L188W, L197*, L197M, L197P, L197R, L197T, L202F, L202H, L202I, L202P, L202R, L202S, L203P, L203S, L203W, L211*, L211A, L211S, L223*, L223I, L223V, L228F, L228H, L228T, L239*, L239F, L239T, L250*, L250P, L250T, L44*, L44M, L47C, L47V, L57*, L57X, L60S, L79F, L79S, L84W, L90*, L90V, M240D, M240L, M240R, M240W, N11D, N11K, N124T, N177*, N177T, N229*, N229T, N231D, N231F, N231K, N231L, N231M, N231Q, N231T, N243Q, N243T, N252E, N252T, N61R, N61T, N61Y, N62K, N62M, N67D, N67T, P137L, P13A, P13H, P13L, P13S, P154L, P154R, P154T, P180L, P180S, P185L, P185S, P185V, P194Q, P200A, P200L, P200S, P200T, P201A, P201L, P201R, P201S, P214T, P236L, P236T, P246L, P246Q, P249A, P249F, P249H, P249I, P249X, P30L, P30S, P42L, P83A, Q103K, Q135S, Q136N, Q157R, Q157S, Q221A, Q221R, Q248F, Q248L, Q248S, Q254A, Q254K, Q28S, Q53H, Q53K, Q53N, Q74R, Q92H, Q92S, R181H, R181S, R181V, R226H, R226P, R226V, R245A, R253G, R253Q, R27A, R58G, R89D, R89F, R89I, R89X, R89Y, S105L, S105Q, S151A, S151I, S151Q, S165F, S165P, S172E, S172V, S187I, S187P, S196H, S196L, S216A, S216Q, S218A, S218Q, S219A, S219Q, S258F, S258P, S29C, S29P, S43P, S43T, S48L, S50P, S56F, S56N, S56P, S56X, S73L, S73N, S73X, S99H, T108L, T125I, T125P, T168K, T168N, T168Q, T176H, T176L, T192D, T192F, T192I, T192N, T192P, T192X, T198D, T198I, T198P, T199A, T199H, T199P, T207D, T207I, T207P, T207S, T35I, T35L, T37Q, T55L, T87L, V109M, V109W, V121F, V134C, V134F, V142F, V149G, V149L, V159L, V159S, V160C, V160L, V162A, V162C, V206*, V206C, V206M, V210C, V217L, V217R, V217S, V222A, V222C, V222G, V241G, V241W, V241X, V31L, V49F, V68L, V68W, V78C, W123G, W123R, W16G, W191*, W191G, W191L, W208G, W208L, W208S, W244*, W244G, W244L, W97C, W97G, Y114H, Y114M, Y127M, Y190*, Y190L, Y190T, Y193C, Y193F, Y193I, Y193L, Y193T, Y193V, Y193X, Y40M, Y51F, Y51M, Y51T, Y51X, Y88T, K9N, S29A, но не ограничиваясь ими.

[0093] В одном варианте осуществления SRE системы биоцикла, которая включает полностью или частично карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717), может включать мутацию, выбранную из E106D, G63D, H122Y, I59N, L156H, L183S, L197P, S56F, S56N, W208S, Y193I и Y51T.

[0094] SRE системы биоцикла, которая включает полностью или частично карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717), может включать множество мутаций, таких как, без ограничения, CA2 (ак 2-260 ДТ, R27L, H122Y), CA2 (ак 2-260 ДТ, T87I, H122Y), CA2 (ак 2-260 ДТ, H122Y, N252D), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, V241F), CA2 (ак 2-260 ДТ, V241F, P249L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71L, L250R), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249F), CA2 (ак 2-260 ДТ, T55K, G63N, Q248N), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, A257del, S258del, F259del, K260del), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, S2del, H3del, H4del, W5del), CA2 (ак 2-260 ДТ, W4Y, L156H), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, G234del, E235del, P236del), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, F225L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D70N, D74N, D100N, L156H), (CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, G102R)(SEQ ID NO: 210598), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, E69V, N231I)(SEQ ID NO. 210748), CA2 (ак 2-260 ДТ, R27L, T87I, H122Y, N252D)(SEQ ID NO. 210702), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, V241F, P249L)(SEQ ID NO. 210503), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71L, T87N, L250R)(SEQ ID NO. 210510), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, S172C, F178Y, E186D)(SEQ ID NO. 210756), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71F, N231F)(SEQ ID NO. 210505), CA2 (ак 2-260 ДТ, A77I, P249F)(SEQ ID NO. 210514), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, P249H)(SEQ ID NO. 210516), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249H)(SEQ ID NO. 210518), CA2 (ак 2-260 ДТ, Q53N, N61Y)(SEQ ID NO. 210521), CA2 (ак 2-260 ДТ, E106D, C205S)(SEQ ID NO. 210523), CA2 (ак 2-260 ДТ, C205S, W208S)(SEQ ID NO. 210525), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73N, R89Y)(SEQ ID NO. 210532), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, T192F)(SEQ ID NO. 210534), CA2 (ак 2-260 ДТ, Y193L, K260L)(SEQ ID NO. 210540), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71F, V241F, P249L)(SEQ ID NO. 210544), CA2 (ак 2-260 ДТ, L147F, Q248F)(SEQ ID NO. 210548), CA2 (ак 2-260 ДТ, D52I, S258P)(SEQ ID NO. 210550), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72S, T192N)(SEQ ID NO. 210552), CA2 (ак 2-260 ДТ, D179E, T192I)(SEQ ID NO. 210554), CA2 (ак 2-260 ДТ, S56N, Q103K)(SEQ ID NO. 210558), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71Y, Q248L)(SEQ ID NO. 210560), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73N, R89F)(SEQ ID NO. 210562), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, N231L, E235G, L239F)(SEQ ID NO. 210564), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249I)(SEQ ID NO. 210568), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72X, V241X, P249X)(SEQ ID NO. 210572), CA2 (ак 2-260 ДТ, A54X, S56X, L57X, T192X)(SEQ ID NO. 210574), CA2 (ак 2-260 ДТ, Y193V, K260F)(SEQ ID NO. 210576), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, M240L)(SEQ ID NO. 210578), CA2 (ак 2-260 ДТ, V134F, L228F)(SEQ ID NO. 210580), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71G, N231K)(SEQ ID NO. 210582), CA2 (ак 2-260 ДТ, S56F, D71S)(SEQ ID NO. 210584), CA2 (ак 2-260 ДТ, D52L, G128R, Q248F)(SEQ ID NO. 210586), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73X, R89X)(SEQ ID NO. 210588), CA2 (ак 2-260 ДТ, Y51X, D72X, V241X, P249X)(SEQ ID NO. 210592), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72I, W97C)(SEQ ID NO. 210594), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, T192F, N231F)(SEQ ID NO. 210596), CA2 (ак 2-260 ДТ, H36Q, S43T, Y51F, N67D, G131W, R226H)(SEQ ID NO. 210698), CA2 (ак 2-260 ДТ, F70I, F146V)(SEQ ID NO. 210700), CA2 (ак 2-260 ДТ, K45N, V68L, H119Y, K169R, D179E)(SEQ ID NO. 210704), CA2 (ак 2-260 ДТ, H15L, A54V, K111E, E220K, F225I)(SEQ ID NO. 210706), CA2 (ак 2-260 ДТ, P13S, P83A, D101G, K111N, F230I)(SEQ ID NO. 210708), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, W123R, E220K)(SEQ ID NO. 210712), CA2 (ак 2-260 ДТ, N11D, E69K, G86D, V109M, K113I, T125I, D138G, G155S)(SEQ ID NO. 210714), CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, G102R, A173T)(SEQ ID NO. 210716), CA2 (ак 2-260 ДТ, L79F, P180S)(SEQ ID NO. 210718), CA2 (ак 2-260 ДТ, A77P, G102R, D138N)(SEQ ID NO. 210724), CA2 (ак 2-260 ДТ, F20L, K45N, G63D, E69V, N231I)(SEQ ID NO. 210726), CA2 (ак 2-260 ДТ, T199N, L202P, L228F)(SEQ ID NO. 210728), CA2 (ак 2-260 ДТ, K9N, H122Y, T168K)(SEQ ID NO. 210730), CA2 (ак 2-260 ДТ, Q53H, L90V, Q92H, G131E)(SEQ ID NO. 210732), CA2 (ак 2-260 ДТ, L44M, L47V, N62K, E69D)(SEQ ID NO. 210734), CA2 (ак 2-260 ДТ, D75V, K169N, F259L)(SEQ ID NO. 210738), CA2 (ак 2-260 ДТ, T207S, V222A, N231D)(SEQ ID NO. 210740), CA2 (ак 2-260 ДТ, I59F, V206M, G232R)(SEQ ID NO. 210742), CA2 (ак 2-260 ДТ, P13A, A133T)(SEQ ID NO. 210744), CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, R89I)(SEQ ID

NO. 210750), CA2 (ак 2-260 ДТ, A65N, G86D, G131R, G155D, K158N, V162A, G170D, P236L)(SEQ ID NO. 210752), CA2 (ак 2-260 ДТ, G12R, H15Y, D19V)(SEQ ID NO. 210754), CA2 (ак 2-260 ДТ, A65V, F95Y, E106G, H107Q, I145M, F175I)(SEQ ID NO. 210758) и/или CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, E69V, N231I)(SEQ ID NO. 210851 или 210847).

[0095] В одном варианте осуществления SRE системы биоцикла, которая включает полностью или частично карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717), может включать множество мутаций, выбранных из CA2 (ак 2-260 ДТ, R27L, H122Y), CA2 (ак 2-260 ДТ, T87I, H122Y), CA2 (ак 2-260 ДТ, H122Y, N252D), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, V241F), CA2 (ак 2-260 ДТ, V241F, P249L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71L, L250R), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249F), CA2 (ак 2-260 ДТ, T55K, G63N, Q248N), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, A257del, S258del, F259del, K260del), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, S2del, H3del, H4del, W5del), CA2 (ак 2-260 ДТ, W4Y, L156H), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, G234del, E235del, P236del), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, F225L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D70N, D74N, D100N, L156H), (CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, G102R)(SEQ ID NO: 210598), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, E69V, N231I)(SEQ ID NO. 210748), CA2 (ак 2-260 ДТ, R27L, T87I, H122Y, N252D)(SEQ ID NO. 210702), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, V241F, P249L)(SEQ ID NO. 210503), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71L, T87N, L250R)(SEQ ID NO. 210510), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, S172C, F178Y, E186D)(SEQ ID NO. 210756), CA2 (ак 2-260 ДТ, A77I, P249F)(SEQ ID NO. 210514), CA2 (ак 2-260 ДТ, E106D, C205S)(SEQ ID NO. 210523), CA2 (ак 2-260 ДТ, C205S, W208S)(SEQ ID NO. 210525), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73N, R89Y)(SEQ ID NO. 210532), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, T192F)(SEQ ID NO. 210534), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73N, R89F)(SEQ ID NO. 210562), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, M240L)(SEQ ID NO. 210578), CA2 (ак 2-260 ДТ, V134F, L228F)(SEQ ID NO. 210580) и/или CA2 (ак 2-260 ДТ, S56F, D71S)(SEQ ID NO. 210584).

[0096]

Коэффициент стабилизации и дестабилизации SRE

[0097] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены способы модуляции экспрессии, функции или уровня белка путем измерения коэффициента стабилизации и коэффициента дестабилизации. Как используется в данном документе, коэффициент стабилизации может быть определен как отношение экспрессии, функции или уровня представляющего интерес белка в ответ на стимул к экспрессии, функции или уровню представляющего интерес белка в отсутствие стимула, специфичного для SRE. В некоторых аспектах коэффициент стабилизации составляет по меньшей мере 1, например, по меньшей мере 1-10, 1-20, 1-30, 1-40, 1-50, 1-60, 1-70, 1-80, 1-90, 1-100, 20-30, 20-40, 20-50, 20-60, 20-70, 20-80, 20-90, 20-95, 20-100, 30-40, 30-50, 30-60, 30-70, 30-80, 30-90, 30-95, 30-100, 40-50, 40-60, 40-70, 40-80, 40-90, 40-95, 40-100, 50-60, 50-70, 50-80, 50-90, 50-95, 50-100, 60-70, 60-80, 60-90, 60-95, 60-100, 70-80, 70-90, 70-95, 70-100, 80-90, 80-95, 80-100, 90-95, 90-100 или 95-100. Как используется в настоящем документе, коэффициент дестабилизации может быть определен как отношение экспрессии, функции или уровня представляющего интерес белка в отсутствие стимула, специфичного для эффекторного модуля, к экспрессии, функции или уровню представляющего интерес белка, который экспрессируется конститутивно и в отсутствие стимула, специфичного для SRE. Как используется в настоящем документе, «конститутивно» означает экспрессию, функцию или уровень представляющего интерес белка, который не связан с SRE и поэтому экспрессируется как в присутствии, так и в отсутствие стимула. В некоторых аспектах коэффициент дестабилизации составляет по меньшей мере 0, например, по меньшей мере 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, или по меньшей мере 0-0,1, 0-0,2, 0-0,3, 0-0,4, 0-0,5, 0-0,6, 0-0,7, 0-0,8, 0-0,9, 0,1-0,2, 0,1-0,3, 0,1-0,4, 0,1-

0,5, 0,1-0,6, 0,1-0,7, 0,1-0,8, 0,1-0,9, 0,2-0,3, 0,2-0,4, 0,2-0,5, 0,2-0,6, 0,2-0,7, 0,2-0,8, 0,2-0,9, 0,3-0,4, 0,3-0,5, 0,3-0,6, 0,3-0,7, 0,3-0,8, 0,3-0,9, 0,4-0,5, 0,4-0,6, 0,4-0,7, 0,4-0,8, 0,4-0,9, 0,5-0,6, 0,5-0,7, 0,5-0,8, 0,5-0,9, 0,6-0,7, 0,6-0,8, 0,6-0,9, 0,7-0,8, 0,7-0,9 или 0,8-0,9.

[0098] В некоторых вариантах осуществления SRE эффекторного модуля может стабилизировать представляющую интерес полезную нагрузку при коэффициенте стабилизации 1 или более, при этом коэффициент стабилизации может включать отношение экспрессии, функции или уровня представляющей интерес полезной нагрузки в присутствии стимула к экспрессии, функции или уровню представляющей интерес полезной нагрузки в отсутствие стимула.

[0099] В некоторых вариантах осуществления SRE может дестабилизировать представляющую интерес полезную нагрузку при коэффициенте дестабилизации от 0 до 0,09, при этом коэффициент дестабилизации может включать отношение экспрессии, функции или уровня представляющей интерес полезной нагрузки в отсутствие стимула, специфичного для SRE, к экспрессии, функции или уровню представляющей интерес полезной нагрузки, которая экспрессируется конститутивно и в отсутствие стимула, специфичного для SRE.

Белково-белковые взаимодействия SRE

[0100] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен элемент ответа на стимул (SRE), который может содержать дестабилизирующий домен (ДД), полученный из карбоангидразы 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717) полностью или частично. В одном варианте осуществления ДД может включать целую CA2 (SEQ ID NO: 11717). В некоторых вариантах осуществления ДД может включать часть или область карбоангидразы человека. Часть или область CA2 может быть выбрана, без ограничения, из аминокислот 2-260 CA2 (SEQ ID NO: 11717), таких как, без ограничения, SEQ ID NO: (210492); аминокислот 1-142 CA2 (SEQ ID NO: 11717), таких как, без ограничения, SEQ ID NO: (210820); аминокислот 2-142 CA2 (SEQ ID NO: 11717), таких как, без ограничения, SEQ ID NO: (210821); аминокислот 1-190 CA2 (SEQ ID NO: 11717), таких как, без ограничения, SEQ ID NO: (210822); аминокислот 2-190 CA2 (SEQ ID NO: 11717), таких как, без ограничения, SEQ ID NO: (210823); аминокислот 1-89 CA2 (SEQ ID NO: 11717), таких как, без ограничения, SEQ ID NO: (210824); аминокислот 2-89 CA2 (SEQ ID NO: 11717), таких как, без ограничения, SEQ ID NO: (210825); аминокислот 1-243 CA2 (SEQ ID NO: 11717), таких как, без ограничения, SEQ ID NO: (210826); аминокислот 2-243 CA2 (SEQ ID NO: 11717), таких как, без ограничения, SEQ ID NO: (210827); аминокислот 1-166 CA2 (SEQ ID NO: 11717), таких как, без ограничения, SEQ ID NO: (210828); аминокислот 2-166 CA2 (SEQ ID NO: 11717), таких как, без ограничения, SEQ ID NO: (210782); аминокислот 1-116 CA2 (SEQ ID NO: 11717), таких как, без ограничения, SEQ ID NO: (210830); аминокислот 2-116 CA2 (SEQ ID NO: 11717), таких как, без ограничения, SEQ ID NO: (210831); аминокислот 1-152 CA2 (SEQ ID NO: 11717), таких как, без ограничения, SEQ ID NO: (210832); аминокислот 2-152 CA2 (SEQ ID NO: 11717), таких как, без ограничения, SEQ ID NO: (210833); аминокислот 1-43 CA2 (SEQ ID NO: 11717), таких как, без ограничения, SEQ ID NO: (210834); или аминокислот 2-43 CA2 (SEQ ID NO: 11717), таких как, без ограничения, SEQ ID NO: (210835). В одном варианте осуществления ДД может включать аминокислоты 2-260 CA2 (SEQ ID NO: 11717). В одном варианте осуществления ДД может включать аминокислоты 2-260 CA2 (SEQ ID NO: 11717), такие как, без ограничения, SEQ ID NO: 210492.

[0101] В одном варианте осуществления ДД может включать аминокислоты 2-260 CA2 (SEQ ID NO: 11717).

[0102] В некоторых вариантах осуществления ДД может включать одну, две, три или более мутаций, таких как A115L, A116Q, A116V, A133L, A133T, A141P, A152D, A152L, A152R, A173C, A173G, A173L, A173T, A23P, A247L, A247S, A257L, A257S, A38P, A38V, A54Q, A54V, A54X, A65L, A65N, A65V, A77I, A77P, A77Q, C205M, C205R, C205V, C205W, C205Y, D101G, D101M, D110I, D129I, D138G, D138M, D138N, D161*, D161M, D161V, D164G, D164I, D174*, D174T, D179E, D179I, D179R, D189G, D189I, D19T, D19V, D242G, D242T, D32T, D34T, D41T, D52I, D52L, D71F, D71G, D71K, D71M, D71S, D71Y, D72I, D72S, D72T, D72X, D75T, D75V, D85M, E106D, E106G, E106S, E117*, E117N, E14N, E186*, E186N, E204A, E204D, E204G, E204N, E213*, E213G, E213N, E220K, E220R, E220S, E233D, E233G, E233R, E235*, E235G, E235N, E237K, E237R, E238*, E238N, E238R, E26S, E69D, E69K, E69S, F130L, F146V, F175I, F175L, F175S, F178L, F178S, F20L, F20S, F225I, F225L, F225S, F225Y, F230I, F230L, F230S, F259L, F259S, F66S, F70I, F70L, F95Y, G102D, G104R, G104V, G128R, G12D, G12E, G131E, G131R, G131W, G139D, G144D, G144V, G150A, G150S, G150W, G155A, G155C, G155D, G155S, G170A, G170D, G182A, G182W, G195A, G195R, G232R, G232W, G234L, G234V, G25E, G63D, G63V, G81E, G81V, G82D, G86A, G86D, G98V, H107I, H107Q, H119T, H119Y, H122T, H122Y, H15L, H15T, H15Y, H17D, H17I, H36I, H36Q, H64M, H94T, H96T, I145F, I145M, I166H, I166L, I209D, I209L, I215H, I215S, I22L, I255N, I255S, I33S, I59F, I59N, I59S, I91F, K111E, K111N, K112R, K113I, K113N, K126N, K132E, K132R, K148E, K148R, K153*, K153N, K158E, K158N, K167*, K169N, K169R, K171Q, K171R, K18R, K212N, K212Q, K212R, K212W, K224E, K224N, K227*, K227N, K24R, K251E, K251R, K256Q, K260F, K260L, K260Q, K39S, K45N, K45S, K80M, K80R, L118F, L120W, L140V, L140W, L143*, L147*, L147F, L156F, L156H, L156P, L156Q, L163A, L163W, L183P, L183S, L184F, L184P, L188P, L188W, L197*, L197M, L197P, L197R, L197T, L202F, L202H, L202I, L202P, L202R, L202S, L203P, L203S, L203W, L211*, L211A, L211S, L223*, L223I, L223V, L228F, L228H, L228T, L239*, L239F, L239T, L250*, L250P, L250T, L44*, L44M, L47C, L47V, L57*, L57X, L60S, L79F, L79S, L84W, L90*, L90V, M240D, M240L, M240R, M240W, N11D, N11K, N124T, N177*, N177T, N229*, N229T, N231D, N231F, N231K, N231L, N231M, N231Q, N231T, N243Q, N243T, N252E, N252T, N61R, N61T, N61Y, N62K, N62M, N67D, N67T, P137L, P13A, P13H, P13L, P13S, P154L, P154R, P154T, P180L, P180S, P185L, P185S, P185V, P194Q, P200A, P200L, P200S, P200T, P201A, P201L, P201R, P201S, P214T, P236L, P236T, P246L, P246Q, P249A, P249F, P249H, P249I, P249X, P30L, P30S, P42L, P83A, Q103K, Q135S, Q136N, Q157R, Q157S, Q221A, Q221R, Q248F, Q248L, Q248S, Q254A, Q254K, Q28S, Q53H, Q53K, Q53N, Q74R, Q92H, Q92S, R181H, R181S, R181V, R226H, R226P, R226V, R245A, R253G, R253Q, R27A, R58G, R89D, R89F, R89I, R89X, R89Y, S105L, S105Q, S151A, S151I, S151Q, S165F, S165P, S172E, S172V, S187I, S187P, S196H, S196L, S216A, S216Q, S218A, S218Q, S219A, S219Q, S258F, S258P, S29C, S29P, S43P, S43T, S48L, S50P, S56F, S56N, S56P, S56X, S73L, S73N, S73X, S99H, T108L, T125I, T125P, T168K, T168N, T168Q, T176H, T176L, T192D, T192F, T192I, T192N, T192P, T192X, T198D, T198I, T198P, T199A, T199H, T199P, T207D, T207I, T207P, T207S, T35I, T35L, T37Q, T55L, T87L, V109M, V109W, V121F, V134C, V134F, V142F, V149G, V149L, V159L, V159S, V160C, V160L, V162A, V162C, V206*, V206C, V206M, V210C, V217L, V217R, V217S, V222A, V222C, V222G, V241G, V241W, V241X, V31L, V49F, V68L, V68W, V78C, W123G, W123R, W16G, W191*, W191G, W191L, W208G, W208L, W208S, W244*, W244G, W244L, W97C, W97G, Y114H, Y114M, Y127M, Y190*, Y190L, Y190T, Y193C, Y193F, Y193I, Y193L, Y193T, Y193V, Y193X, Y40M, Y51F, Y51M, Y51T, Y51X, Y88T, K9N, S29A, но не ограничиваясь ими. Как используется в настоящем документе, «*» обозначает трансляцию стоп-кодона, а X обозначает любую аминокислоту.

[0103] В одном варианте осуществления ДД может включать мутацию E106D, G63D, H122Y, I59N, L156H, L183S, L197P, S56F, S56N, W208S, Y193I или Y51T.

[0104] В одном варианте осуществления ДД может включать множество мутаций, таких как, без ограничения, CA2 (ак 2-260 ДТ, R27L, H122Y), CA2 (ак 2-260 ДТ, T87I, H122Y), CA2 (ак 2-260 ДТ, H122Y, N252D), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, V241F), CA2 (ак 2-260 ДТ, V241F, P249L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71L, L250R), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249F), CA2 (ак 2-260 ДТ, T55K, G63N, Q248N), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, A257del, S258del, F259del, K260del), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, S2del, H3del, H4del, W5del), CA2 (ак 2-260 ДТ, W4Y, L156H), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, G234del, E235del, P236del), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, F225L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D70N, D74N, D100N, L156H), (CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, G102R)(SEQ ID NO: 210598), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, E69V, N231I)(SEQ ID NO. 210748), CA2 (ак 2-260 ДТ, R27L, T87I, H122Y, N252D)(SEQ ID NO. 210702), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, V241F, P249L)(SEQ ID NO. 210503), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71L, T87N, L250R)(SEQ ID NO. 210510), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, S172C, F178Y, E186D)(SEQ ID NO. 210756), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71F, N231F)(SEQ ID NO. 210505), CA2 (ак 2-260 ДТ, A77I, P249F)(SEQ ID NO. 210514), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, P249H)(SEQ ID NO. 210516), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249H)(SEQ ID NO. 210518), CA2 (ак 2-260 ДТ, Q53N, N61Y)(SEQ ID NO. 210521), CA2 (ак 2-260 ДТ, E106D, C205S)(SEQ ID NO. 210523), CA2 (ак 2-260 ДТ, C205S, W208S)(SEQ ID NO. 210525), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73N, R89Y)(SEQ ID NO. 210532), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, T192F)(SEQ ID NO. 210534), CA2 (ак 2-260 ДТ, Y193L, K260L)(SEQ ID NO. 210540), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71F, V241F, P249L)(SEQ ID NO. 210544), CA2 (ак 2-260 ДТ, L147F, Q248F)(SEQ ID NO. 210548), CA2 (ак 2-260 ДТ, D52I, S258P)(SEQ ID NO. 210550), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72S, T192N)(SEQ ID NO. 210552), CA2 (ак 2-260 ДТ, D179E, T192I)(SEQ ID NO. 210554), CA2 (ак 2-260 ДТ, S56N, Q103K)(SEQ ID NO. 210558), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71Y, Q248L)(SEQ ID NO. 210560), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73N, R89F)(SEQ ID NO. 210562), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, N231L, E235G, L239F)(SEQ ID NO. 210564), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249I)(SEQ ID NO. 210568), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72X, V241X, P249X)(SEQ ID NO. 210572), CA2 (ак 2-260 ДТ, A54X, S56X, L57X, T192X)(SEQ ID NO. 210574), CA2 (ак 2-260 ДТ, Y193V, K260F)(SEQ ID NO. 210576), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, M240L)(SEQ ID NO. 210578), CA2 (ак 2-260 ДТ, V134F, L228F)(SEQ ID NO. 210580), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71G, N231K)(SEQ ID NO. 210582), CA2 (ак 2-260 ДТ, S56F, D71S)(SEQ ID NO. 210584), CA2 (ак 2-260 ДТ, D52L, G128R, Q248F)(SEQ ID NO. 210586), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73X, R89X)(SEQ ID NO. 210588), CA2 (ак 2-260 ДТ, Y51X, D72X, V241X, P249X)(SEQ ID NO. 210592), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72I, W97C)(SEQ ID NO. 210594), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, T192F, N231F)(SEQ ID NO. 210596), CA2 (ак 2-260 ДТ, H36Q, S43T, Y51F, N67D, G131W, R226H)(SEQ ID NO. 210698), CA2 (ак 2-260 ДТ, F70I, F146V)(SEQ ID NO. 210700), CA2 (ак 2-260 ДТ, K45N, V68L, H119Y, K169R, D179E)(SEQ ID NO. 210704), CA2 (ак 2-260 ДТ, H15L, A54V, K111E, E220K, F225I)(SEQ ID NO. 210706), CA2 (ак 2-260 ДТ, P13S, P83A, D101G, K111N, F230I)(SEQ ID NO. 210708), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, W123R, E220K)(SEQ ID NO. 210712), CA2 (ак 2-260 ДТ, N11D, E69K, G86D, V109M, K113I, T125I, D138G, G155S)(SEQ ID NO. 210714), CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, G102R, A173T)(SEQ ID NO. 210716), CA2 (ак 2-260 ДТ, L79F, P180S)(SEQ ID NO. 210718), CA2 (ак 2-260 ДТ, A77P, G102R, D138N)(SEQ ID NO. 210724), CA2 (ак 2-260 ДТ, F20L, K45N, G63D, E69V, N231I)(SEQ ID NO. 210726), CA2 (ак 2-260 ДТ, T199N, L202P, L228F)(SEQ ID NO. 210728), CA2 (ак 2-260 ДТ, K9N, H122Y, T168K)(SEQ ID NO. 210730), CA2 (ак 2-260 ДТ, Q53H, L90V, Q92H, G131E)(SEQ ID NO. 210732), CA2 (ак 2-260 ДТ, L44M, L47V, N62K, E69D)(SEQ ID NO. 210734), CA2 (ак 2-260 ДТ, D75V, K169N, F259L)(SEQ ID NO. 210738), CA2 (ак 2-260 ДТ, T207S, V222A, N231D)(SEQ ID NO. 210740), CA2 (ак 2-260

ДТ, I59F, V206M, G232R)(SEQ ID NO. 210742), CA2 (ак 2-260 ДТ, P13A, A133T)(SEQ ID NO. 210744), CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, R89I)(SEQ ID NO. 210750), CA2 (ак 2-260 ДТ, A65N, G86D, G131R, G155D, K158N, V162A, G170D, P236L)(SEQ ID NO. 210752), CA2 (ак 2-260 ДТ, G12R, H15Y, D19V)(SEQ ID NO. 210754), CA2 (ак 2-260 ДТ, A65V, F95Y, E106G, H107Q, I145M, F175I)(SEQ ID NO. 210758) и/или CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, E69V, N231I)(SEQ ID NO. 210851 или 210847).

[0105] В одном варианте осуществления, ДД может включать CA2 (ак 2-260 ДТ, R27L, H122Y), CA2 (ак 2-260 ДТ, T87I, H122Y), CA2 (ак 2-260 ДТ, H122Y, N252D), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, V241F), CA2 (ак 2-260 ДТ, V241F, P249L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71L, L250R), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249F), CA2 (ак 2-260 ДТ, T55K, G63N, Q248N), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, A257del, S258del, F259del, K260del), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, S2del, H3del, H4del, W5del), CA2 (ак 2-260 ДТ, W4Y, L156H), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, G234del, E235del, P236del), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, F225L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D70N, D74N, D100N, L156H), (CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, G102R)(SEQ ID NO: 210598), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, E69V, N231I)(SEQ ID NO. 210748), CA2 (ак 2-260 ДТ, R27L, T87I, H122Y, N252D)(SEQ ID NO. 210702), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, V241F, P249L)(SEQ ID NO. 210503), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71L, T87N, L250R)(SEQ ID NO. 210510), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, S172C, F178Y, E186D)(SEQ ID NO. 210756), CA2 (ак 2-260 ДТ, A77I, P249F)(SEQ ID NO. 210514), CA2 (ак 2-260 ДТ, E106D, C205S)(SEQ ID NO. 210523), CA2 (ак 2-260 ДТ, C205S, W208S)(SEQ ID NO. 210525), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73N, R89Y)(SEQ ID NO. 210532), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, T192F)(SEQ ID NO. 210534), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73N, R89F)(SEQ ID NO. 210562), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, M240L)(SEQ ID NO. 210578), CA2 (ак 2-260 ДТ, V134F, L228F)(SEQ ID NO. 210580) и/или CA2 (ак 2-260 ДТ, S56F, D71S)(SEQ ID NO. 210584).

[0106] В одном варианте осуществления ДД может включать аминокислоты 2-260 CA2 (SEQ ID NO: 11717), такие как, без ограничения, SEQ ID NO: (210492).

[0107] В одном варианте осуществления SRE может представлять собой, без ограничения, CA2 (ак 2-260 ДТ, R27L, H122Y), CA2 (ак 2-260 ДТ, T87I, H122Y), CA2 (ак 2-260 ДТ, H122Y, N252D), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, V241F), CA2 (ак 2-260 ДТ, V241F, P249L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71L, L250R), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249F), CA2 (ак 2-260 ДТ, T55K, G63N, Q248N), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, A257del, S258del, F259del, K260del), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, S2del, H3del, H4del, W5del), CA2 (ак 2-260 ДТ, W4Y, L156H), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, G234del, E235del, P236del), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, F225L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D70N, D74N, D100N, L156H), (CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, G102R)(SEQ ID NO: 210598), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, E69V, N231I)(SEQ ID NO. 210748), CA2 (ак 2-260 ДТ, R27L, T87I, H122Y, N252D)(SEQ ID NO. 210702), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, V241F, P249L)(SEQ ID NO. 210503), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71L, T87N, L250R)(SEQ ID NO. 210510), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, S172C, F178Y, E186D)(SEQ ID NO. 210756), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71F, N231F)(SEQ ID NO. 210505), CA2 (ак 2-260 ДТ, A77I, P249F)(SEQ ID NO. 210514), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, P249H)(SEQ ID NO. 210516), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249H)(SEQ ID NO. 210518), CA2 (ак 2-260 ДТ, Q53N, N61Y)(SEQ ID NO. 210521), CA2 (ак 2-260 ДТ, E106D, C205S)(SEQ ID NO. 210523), CA2 (ак 2-260 ДТ, C205S, W208S)(SEQ ID NO. 210525), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73N, R89Y)(SEQ ID NO. 210532), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, T192F)(SEQ ID NO. 210534), CA2 (ак 2-260 ДТ, Y193L, K260L)(SEQ ID NO. 210540), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71F, V241F, P249L)(SEQ ID NO. 210544), CA2 (ак 2-260 ДТ, L147F, Q248F)(SEQ ID NO. 210548), CA2 (ак 2-260 ДТ, D52I, S258P)(SEQ ID NO. 210550), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72S, T192N)(SEQ ID NO. 210552), CA2 (ак 2-260 ДТ, D179E, T192I)(SEQ ID NO. 210554), CA2 (ак 2-260 ДТ, S56N, Q103K)(SEQ ID NO.

210558), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71Y, Q248L)(SEQ ID NO. 210560), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73N, R89F)(SEQ ID NO. 210562), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, N231L, E235G, L239F)(SEQ ID NO. 210564), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249I)(SEQ ID NO. 210568), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72X, V241X, P249X)(SEQ ID NO. 210572), CA2 (ак 2-260 ДТ, A54X, S56X, L57X, T192X)(SEQ ID NO. 210574), CA2 (ак 2-260 ДТ, Y193V, K260F)(SEQ ID NO. 210576), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, M240L)(SEQ ID NO. 210578), CA2 (ак 2-260 ДТ, V134F, L228F)(SEQ ID NO. 210580), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71G, N231K)(SEQ ID NO. 210582), CA2 (ак 2-260 ДТ, S56F, D71S)(SEQ ID NO. 210584), CA2 (ак 2-260 ДТ, D52L, G128R, Q248F)(SEQ ID NO. 210586), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73X, R89X)(SEQ ID NO. 210588), CA2 (ак 2-260 ДТ, Y51X, D72X, V241X, P249X)(SEQ ID NO. 210592), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72I, W97C)(SEQ ID NO. 210594), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, T192F, N231F)(SEQ ID NO. 210596), CA2 (ак 2-260 ДТ, H36Q, S43T, Y51F, N67D, G131W, R226H)(SEQ ID NO. 210698), CA2 (ак 2-260 ДТ, F70I, F146V)(SEQ ID NO. 210700), CA2 (ак 2-260 ДТ, K45N, V68L, H119Y, K169R, D179E)(SEQ ID NO. 210704), CA2 (ак 2-260 ДТ, H15L, A54V, K111E, E220K, F225I)(SEQ ID NO. 210706), CA2 (ак 2-260 ДТ, P13S, P83A, D101G, K111N, F230I)(SEQ ID NO. 210708), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, W123R, E220K)(SEQ ID NO. 210712), CA2 (ак 2-260 ДТ, N11D, E69K, G86D, V109M, K113I, T125I, D138G, G155S)(SEQ ID NO. 210714), CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, G102R, A173T)(SEQ ID NO. 210716), CA2 (ак 2-260 ДТ, L79F, P180S)(SEQ ID NO. 210718), CA2 (ак 2-260 ДТ, A77P, G102R, D138N)(SEQ ID NO. 210724), CA2 (ак 2-260 ДТ, F20L, K45N, G63D, E69V, N231I)(SEQ ID NO. 210726), CA2 (ак 2-260 ДТ, T199N, L202P, L228F)(SEQ ID NO. 210728), CA2 (ак 2-260 ДТ, K9N, H122Y, T168K)(SEQ ID NO. 210730), CA2 (ак 2-260 ДТ, Q53H, L90V, Q92H, G131E)(SEQ ID NO. 210732), CA2 (ак 2-260 ДТ, L44M, L47V, N62K, E69D)(SEQ ID NO. 210734), CA2 (ак 2-260 ДТ, D75V, K169N, F259L)(SEQ ID NO. 210738), CA2 (ак 2-260 ДТ, T207S, V222A, N231D)(SEQ ID NO. 210740), CA2 (ак 2-260 ДТ, I59F, V206M, G232R)(SEQ ID NO. 210742), CA2 (ак 2-260 ДТ, P13A, A133T)(SEQ ID NO. 210744), CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, R89I)(SEQ ID NO. 210750), CA2 (ак 2-260 ДТ, A65N, G86D, G131R, G155D, K158N, V162A, G170D, P236L)(SEQ ID NO. 210752), CA2 (ак 2-260 ДТ, G12R, H15Y, D19V)(SEQ ID NO. 210754), CA2 (ак 2-260 ДТ, A65V, F95Y, E106G, H107Q, I145M, F175I)(SEQ ID NO. 210758) и/или CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, E69V, N231I)(SEQ ID NO. 210851 или 210847).

[0108] В одном варианте осуществления, ДД может представлять собой CA2 (ак 2-260 ДТ, R27L, H122Y), CA2 (ак 2-260 ДТ, T87I, H122Y), CA2 (ак 2-260 ДТ, H122Y, N252D), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, V241F), CA2 (ак 2-260 ДТ, V241F, P249L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71L, L250R), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249F), CA2 (ак 2-260 ДТ, T55K, G63N, Q248N), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, A257del, S258del, F259del, K260del), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, S2del, H3del, H4del, W5del), CA2 (ак 2-260 ДТ, W4Y, L156H), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, G234del, E235del, P236del), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, F225L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D70N, D74N, D100N, L156H), (CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, G102R)(SEQ ID NO: 210598), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, E69V, N231I)(SEQ ID NO. 210748), CA2 (ак 2-260 ДТ, R27L, T87I, H122Y, N252D)(SEQ ID NO. 210702), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, V241F, P249L)(SEQ ID NO. 210503), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71L, T87N, L250R)(SEQ ID NO. 210510), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, S172C, F178Y, E186D)(SEQ ID NO. 210756), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71F, N231F)(SEQ ID NO. 210505), CA2 (ак 2-260 ДТ, A77I, P249F)(SEQ ID NO. 210514), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, P249H)(SEQ ID NO. 210516), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249H)(SEQ ID NO. 210518), CA2 (ак 2-260 ДТ, Q53N, N61Y)(SEQ ID NO. 210521), CA2 (ак 2-260 ДТ, E106D, C205S)(SEQ ID NO. 210523), CA2 (ак 2-260 ДТ, C205S, W208S)(SEQ ID NO. 210525), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73N, R89Y)(SEQ ID NO. 210532), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, T192F)(SEQ ID NO. 210534), CA2 (ак 2-260 ДТ, Y193L, K260L)(SEQ ID NO. 210540), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71F,

V241F, P249L)(SEQ ID NO. 210544), CA2 (ак 2-260 ДТ, L147F, Q248F)(SEQ ID NO. 210548), CA2 (ак 2-260 ДТ, D52I, S258P)(SEQ ID NO. 210550), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72S, T192N)(SEQ ID NO. 210552), CA2 (ак 2-260 ДТ, D179E, T192I)(SEQ ID NO. 210554), CA2 (ак 2-260 ДТ, S56N, Q103K)(SEQ ID NO. 210558), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71Y, Q248L)(SEQ ID NO. 210560), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73N, R89F)(SEQ ID NO. 210562), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, N231L, E235G, L239F)(SEQ ID NO. 210564), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249I)(SEQ ID NO. 210568), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72X, V241X, P249X)(SEQ ID NO. 210572), CA2 (ак 2-260 ДТ, A54X, S56X, L57X, T192X)(SEQ ID NO. 210574), CA2 (ак 2-260 ДТ, Y193V, K260F)(SEQ ID NO. 210576), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, M240L)(SEQ ID NO. 210578), CA2 (ак 2-260 ДТ, V134F, L228F)(SEQ ID NO. 210580), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71G, N231K)(SEQ ID NO. 210582), CA2 (ак 2-260 ДТ, S56F, D71S)(SEQ ID NO. 210584), CA2 (ак 2-260 ДТ, D52L, G128R, Q248F)(SEQ ID NO. 210586), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73X, R89X)(SEQ ID NO. 210588), CA2 (ак 2-260 ДТ, Y51X, D72X, V241X, P249X)(SEQ ID NO. 210592), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72I, W97C)(SEQ ID NO. 210594), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, T192F, N231F)(SEQ ID NO. 210596), CA2 (ак 2-260 ДТ, H36Q, S43T, Y51F, N67D, G131W, R226H)(SEQ ID NO. 210698), CA2 (ак 2-260 ДТ, F70I, F146V)(SEQ ID NO. 210700), CA2 (ак 2-260 ДТ, K45N, V68L, H119Y, K169R, D179E)(SEQ ID NO. 210704), CA2 (ак 2-260 ДТ, H15L, A54V, K111E, E220K, F225I)(SEQ ID NO. 210706), CA2 (ак 2-260 ДТ, P13S, P83A, D101G, K111N, F230I)(SEQ ID NO. 210708), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, W123R, E220K)(SEQ ID NO. 210712), CA2 (ак 2-260 ДТ, N11D, E69K, G86D, V109M, K113I, T125I, D138G, G155S)(SEQ ID NO. 210714), CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, G102R, A173T)(SEQ ID NO. 210716), CA2 (ак 2-260 ДТ, L79F, P180S)(SEQ ID NO. 210718), CA2 (ак 2-260 ДТ, A77P, G102R, D138N)(SEQ ID NO. 210724), CA2 (ак 2-260 ДТ, F20L, K45N, G63D, E69V, N231I)(SEQ ID NO. 210726), CA2 (ак 2-260 ДТ, T199N, L202P, L228F)(SEQ ID NO. 210728), CA2 (ак 2-260 ДТ, K9N, H122Y, T168K)(SEQ ID NO. 210730), CA2 (ак 2-260 ДТ, Q53H, L90V, Q92H, G131E)(SEQ ID NO. 210732), CA2 (ак 2-260 ДТ, L44M, L47V, N62K, E69D)(SEQ ID NO. 210734), CA2 (ак 2-260 ДТ, D75V, K169N, F259L)(SEQ ID NO. 210738), CA2 (ак 2-260 ДТ, T207S, V222A, N231D)(SEQ ID NO. 210740), CA2 (ак 2-260 ДТ, I59F, V206M, G232R)(SEQ ID NO. 210742), CA2 (ак 2-260 ДТ, P13A, A133T)(SEQ ID NO. 210744), CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, R89I)(SEQ ID NO. 210750), CA2 (ак 2-260 ДТ, A65N, G86D, G131R, G155D, K158N, V162A, G170D, P236L)(SEQ ID NO. 210752), CA2 (ак 2-260 ДТ, G12R, H15Y, D19V)(SEQ ID NO. 210754), CA2 (ак 2-260 ДТ, A65V, F95Y, E106G, H107Q, I145M, F175I)(SEQ ID NO. 210758) и/или CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, E69V, N231I)(SEQ ID NO. 210851 или 210847).

[0109] Также в настоящем документе предложены выделенные варианты полипептидов, содержащие по меньшей мере одну мутацию по сравнению с SEQ ID NO: 11717. Неограничивающие примеры мутаций по сравнению с SEQ ID NO: 11717 включают A115L, A116Q, A116V, A133L, A133T, A141P, A152D, A152L, A152R, A173C, A173G, A173L, A173T, A23P, A247L, A247S, A257L, A257S, A38P, A38V, A54Q, A54V, A54X, A65L, A65N, A65V, A77I, A77P, A77Q, C205M, C205R, C205V, C205W, C205Y, D101G, D101M, D110I, D129I, D138G, D138M, D138N, D161*, D161M, D161V, D164G, D164I, D174*, D174T, D179E, D179I, D179R, D189G, D189I, D19T, D19V, D242G, D242T, D32T, D34T, D41T, D52I, D52L, D71F, D71G, D71K, D71M, D71S, D71Y, D72I, D72S, D72T, D72X, D75T, D75V, D85M, E106D, E106G, E106S, E117*, E117N, E14N, E186*, E186N, E204A, E204D, E204G, E204N, E213*, E213G, E213N, E220K, E220R, E220S, E233D, E233G, E233R, E235*, E235G, E235N, E237K, E237R, E238*, E238N, E238R, E26S, E69D, E69K, E69S, F130L, F146V, F175I, F175L, F175S, F178L, F178S, F20L, F20S, F225I, F225L, F225S, F225Y, F230I, F230L, F230S, F259L, F259S, F66S, F70I, F70L, F95Y, G102D, G104R, G104V, G128R, G12D, G12E, G131E, G131R, G131W, G139D, G144D, G144V, G150A, G150S, G150W, G155A, G155C, G155D, G155S, G170A, G170D, G182A, G182W, G195A, G195R,

G232R, G232W, G234L, G234V, G25E, G63D, G63V, G81E, G81V, G82D, G86A, G86D, G98V, H107I, H107Q, H119T, H119Y, H122T, H122Y, H15L, H15T, H15Y, H17D, H17I, H36I, H36Q, H64M, H94T, H96T, I145F, I145M, I166H, I166L, I209D, I209L, I215H, I215S, I22L, I255N, I255S, I33S, I59F, I59N, I59S, I91F, K111E, K111N, K112R, K113I, K113N, K126N, K132E, K132R, K148E, K148R, K153*, K153N, K158E, K158N, K167*, K169N, K169R, K171Q, K171R, K18R, K212N, K212Q, K212R, K212W, K224E, K224N, K227*, K227N, K24R, K251E, K251R, K256Q, K260F, K260L, K260Q, K39S, K45N, K45S, K80M, K80R, L118F, L120W, L140V, L140W, L143*, L147*, L147F, L156F, L156H, L156P, L156Q, L163A, L163W, L183P, L183S, L184F, L184P, L188P, L188W, L197*, L197M, L197P, L197R, L197T, L202F, L202H, L202I, L202P, L202R, L202S, L203P, L203S, L203W, L211*, L211A, L211S, L223*, L223I, L223V, L228F, L228H, L228T, L239*, L239F, L239T, L250*, L250P, L250T, L44*, L44M, L47C, L47V, L57*, L57X, L60S, L79F, L79S, L84W, L90*, L90V, M240D, M240L, M240R, M240W, N11D, N11K, N124T, N177*, N177T, N229*, N229T, N231D, N231F, N231K, N231L, N231M, N231Q, N231T, N243Q, N243T, N252E, N252T, N61R, N61T, N61Y, N62K, N62M, N67D, N67T, P137L, P13A, P13H, P13L, P13S, P154L, P154R, P154T, P180L, P180S, P185L, P185S, P185V, P194Q, P200A, P200L, P200S, P200T, P201A, P201L, P201R, P201S, P214T, P236L, P236T, P246L, P246Q, P249A, P249F, P249H, P249I, P249X, P30L, P30S, P42L, P83A, Q103K, Q135S, Q136N, Q157R, Q157S, Q221A, Q221R, Q248F, Q248L, Q248S, Q254A, Q254K, Q28S, Q53H, Q53K, Q53N, Q74R, Q92H, Q92S, R181H, R181S, R181V, R226H, R226P, R226V, R245A, R253G, R253Q, R27A, R58G, R89D, R89F, R89I, R89X, R89Y, S105L, S105Q, S151A, S151I, S151Q, S165F, S165P, S172E, S172V, S187I, S187P, S196H, S196L, S216A, S216Q, S218A, S218Q, S219A, S219Q, S258F, S258P, S29C, S29P, S43P, S43T, S48L, S50P, S56F, S56N, S56P, S56X, S73L, S73N, S73X, S99H, T108L, T125I, T125P, T168K, T168N, T168Q, T176H, T176L, T192D, T192F, T192I, T192N, T192P, T192X, T198D, T198I, T198P, T199A, T199H, T199P, T207D, T207I, T207P, T207S, T35I, T35L, T37Q, T55L, T87L, V109M, V109W, V121F, V134C, V134F, V142F, V149G, V149L, V159L, V159S, V160C, V160L, V162A, V162C, V206*, V206C, V206M, V210C, V217L, V217R, V217S, V222A, V222C, V222G, V241G, V241W, V241X, V31L, V49F, V68L, V68W, V78C, W123G, W123R, W16G, W191*, W191G, W191L, W208G, W208L, W208S, W244*, W244G, W244L, W97C, W97G, Y114H, Y114M, Y127M, Y190*, Y190L, Y190T, Y193C, Y193F, Y193I, Y193L, Y193T, Y193V, Y193X, Y40M, Y51F, Y51M, Y51T, Y51X, Y88T, K9N, S29A.

[0110] В некоторых вариантах осуществления, выделенный вариант полипептида может представлять собой CA2 (ак 2-260 ДТ, R27L, H122Y), CA2 (ак 2-260 ДТ, T87I, H122Y), CA2 (ак 2-260 ДТ, H122Y, N252D), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, V241F), CA2 (ак 2-260 ДТ, V241F, P249L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71L, L250R), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249F), CA2 (ак 2-260 ДТ, T55K, G63N, Q248N), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, A257del, S258del, F259del, K260del), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, S2del, H3del, H4del, W5del), CA2 (ак 2-260 ДТ, W4Y, L156H), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, G234del, E235del, P236del), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, F225L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D70N, D74N, D100N, L156H), (CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, G102R)(SEQ ID NO: 210598), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, E69V, N231I)(SEQ ID NO. 210748), CA2 (ак 2-260 ДТ, R27L, T87I, H122Y, N252D)(SEQ ID NO. 210702), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, V241F, P249L)(SEQ ID NO. 210503), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71L, T87N, L250R)(SEQ ID NO. 210510), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, S172C, F178Y, E186D)(SEQ ID NO. 210756), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71F, N231F)(SEQ ID NO. 210505), CA2 (ак 2-260 ДТ, A77I, P249F)(SEQ ID NO. 210514), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, P249H)(SEQ ID NO. 210516), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249H)(SEQ ID NO. 210518), CA2 (ак 2-260 ДТ, Q53N, N61Y)(SEQ ID NO. 210521), CA2 (ак 2-260 ДТ, E106D, C205S)(SEQ ID NO. 210523), CA2 (ак 2-260 ДТ, C205S, W208S)(SEQ ID NO. 210525), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73N, R89Y)(SEQ

ID NO. 210532), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, T192F)(SEQ ID NO. 210534), CA2 (ак 2-260 ДТ, Y193L, K260L)(SEQ ID NO. 210540), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71F, V241F, P249L)(SEQ ID NO. 210544), CA2 (ак 2-260 ДТ, L147F, Q248F)(SEQ ID NO. 210548), CA2 (ак 2-260 ДТ, D52I, S258P)(SEQ ID NO. 210550), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72S, T192N)(SEQ ID NO. 210552), CA2 (ак 2-260 ДТ, D179E, T192I)(SEQ ID NO. 210554), CA2 (ак 2-260 ДТ, S56N, Q103K)(SEQ ID NO. 210558), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71Y, Q248L)(SEQ ID NO. 210560), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73N, R89F)(SEQ ID NO. 210562), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, N231L, E235G, L239F)(SEQ ID NO. 210564), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249I)(SEQ ID NO. 210568), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72X, V241X, P249X)(SEQ ID NO. 210572), CA2 (ак 2-260 ДТ, A54X, S56X, L57X, T192X)(SEQ ID NO. 210574), CA2 (ак 2-260 ДТ, Y193V, K260F)(SEQ ID NO. 210576), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, M240L)(SEQ ID NO. 210578), CA2 (ак 2-260 ДТ, V134F, L228F)(SEQ ID NO. 210580), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71G, N231K)(SEQ ID NO. 210582), CA2 (ак 2-260 ДТ, S56F, D71S)(SEQ ID NO. 210584), CA2 (ак 2-260 ДТ, D52L, G128R, Q248F)(SEQ ID NO. 210586), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73X, R89X)(SEQ ID NO. 210588), CA2 (ак 2-260 ДТ, Y51X, D72X, V241X, P249X)(SEQ ID NO. 210592), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72I, W97C)(SEQ ID NO. 210594), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, T192F, N231F)(SEQ ID NO. 210596), CA2 (ак 2-260 ДТ, H36Q, S43T, Y51F, N67D, G131W, R226H)(SEQ ID NO. 210698), CA2 (ак 2-260 ДТ, F70I, F146V)(SEQ ID NO. 210700), CA2 (ак 2-260 ДТ, K45N, V68L, H119Y, K169R, D179E)(SEQ ID NO. 210704), CA2 (ак 2-260 ДТ, H15L, A54V, K111E, E220K, F225I)(SEQ ID NO. 210706), CA2 (ак 2-260 ДТ, P13S, P83A, D101G, K111N, F230I)(SEQ ID NO. 210708), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, W123R, E220K)(SEQ ID NO. 210712), CA2 (ак 2-260 ДТ, N11D, E69K, G86D, V109M, K113I, T125I, D138G, G155S)(SEQ ID NO. 210714), CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, G102R, A173T)(SEQ ID NO. 210716), CA2 (ак 2-260 ДТ, L79F, P180S)(SEQ ID NO. 210718), CA2 (ак 2-260 ДТ, A77P, G102R, D138N)(SEQ ID NO. 210724), CA2 (ак 2-260 ДТ, F20L, K45N, G63D, E69V, N231I)(SEQ ID NO. 210726), CA2 (ак 2-260 ДТ, T199N, L202P, L228F)(SEQ ID NO. 210728), CA2 (ак 2-260 ДТ, K9N, H122Y, T168K)(SEQ ID NO. 210730), CA2 (ак 2-260 ДТ, Q53H, L90V, Q92H, G131E)(SEQ ID NO. 210732), CA2 (ак 2-260 ДТ, L44M, L47V, N62K, E69D)(SEQ ID NO. 210734), CA2 (ак 2-260 ДТ, D75V, K169N, F259L)(SEQ ID NO. 210738), CA2 (ак 2-260 ДТ, T207S, V222A, N231D)(SEQ ID NO. 210740), CA2 (ак 2-260 ДТ, I59F, V206M, G232R)(SEQ ID NO. 210742), CA2 (ак 2-260 ДТ, P13A, A133T)(SEQ ID NO. 210744), CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, R89I)(SEQ ID NO. 210750), CA2 (ак 2-260 ДТ, A65N, G86D, G131R, G155D, K158N, V162A, G170D, P236L)(SEQ ID NO. 210752), CA2 (ак 2-260 ДТ, G12R, H15Y, D19V)(SEQ ID NO. 210754), CA2 (ак 2-260 ДТ, A65V, F95Y, E106G, H107Q, I145M, F175I)(SEQ ID NO. 210758) и/или CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, E69V, N231I)(SEQ ID NO. 210851 или 210847).

[0111] Также в настоящем документе предложены системы биоциклов, которые включают по меньшей мере один эффекторный модуль. Эффекторный модуль биоцикла может включать элемент ответа на стимул (SRE), а SRE может полностью или частично включать карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717). Биоциклы могут также включать по меньшей мере одну полезную нагрузку, которая может быть прикреплена, добавлена или связана с SRE.

[0112] SRE системы биоцикла, которая включает полностью или частично карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717), может включать одну, две, три или более мутаций, таких как A115L, A116Q, A116V, A133L, A133T, A141P, A152D, A152L, A152R, A173C, A173G, A173L, A173T, A23P, A247L, A247S, A257L, A257S, A38P, A38V, A54Q, A54V, A54X, A65L, A65N, A65V, A77I, A77P, A77Q, C205M, C205R, C205V, C205W, C205Y, D101G, D101M, D110I, D129I, D138G, D138M, D138N, D161*, D161M, D161V, D164G, D164I, D174*, D174T, D179E, D179I, D179R, D189G, D189I, D19T, D19V, D242G, D242T, D32T, D34T, D41T, D52I,

D52L, D71F, D71G, D71K, D71M, D71S, D71Y, D72I, D72S, D72T, D72X, D75T, D75V, D85M, E106D, E106G, E106S, E117*, E117N, E14N, E186*, E186N, E204A, E204D, E204G, E204N, E213*, E213G, E213N, E220K, E220R, E220S, E233D, E233G, E233R, E235*, E235G, E235N, E237K, E237R, E238*, E238N, E238R, E26S, E69D, E69K, E69S, F130L, F146V, F175I, F175L, F175S, F178L, F178S, F20L, F20S, F225I, F225L, F225S, F225Y, F230I, F230L, F230S, F259L, F259S, F66S, F70I, F70L, F95Y, G102D, G104R, G104V, G128R, G12D, G12E, G131E, G131R, G131W, G139D, G144D, G144V, G150A, G150S, G150W, G155A, G155C, G155D, G155S, G170A, G170D, G182A, G182W, G195A, G195R, G232R, G232W, G234L, G234V, G25E, G63D, G63V, G81E, G81V, G82D, G86A, G86D, G98V, H107I, H107Q, H119T, H119Y, H122T, H122Y, H15L, H15T, H15Y, H17D, H17I, H36I, H36Q, H64M, H94T, H96T, I145F, I145M, I166H, I166L, I209D, I209L, I215H, I215S, I22L, I255N, I255S, I33S, I59F, I59N, I59S, I91F, K111E, K111N, K112R, K113I, K113N, K126N, K132E, K132R, K148E, K148R, K153*, K153N, K158E, K158N, K167*, K169N, K169R, K171Q, K171R, K18R, K212N, K212Q, K212R, K212W, K224E, K224N, K227*, K227N, K24R, K251E, K251R, K256Q, K260F, K260L, K260Q, K39S, K45N, K45S, K80M, K80R, L118F, L120W, L140V, L140W, L143*, L147*, L147F, L156F, L156H, L156P, L156Q, L163A, L163W, L183P, L183S, L184F, L184P, L188P, L188W, L197*, L197M, L197P, L197R, L197T, L202F, L202H, L202I, L202P, L202R, L202S, L203P, L203S, L203W, L211*, L211A, L211S, L223*, L223I, L223V, L228F, L228H, L228T, L239*, L239F, L239T, L250*, L250P, L250T, L44*, L44M, L47C, L47V, L57*, L57X, L60S, L79F, L79S, L84W, L90*, L90V, M240D, M240L, M240R, M240W, N11D, N11K, N124T, N177*, N177T, N229*, N229T, N231D, N231F, N231K, N231L, N231M, N231Q, N231T, N243Q, N243T, N252E, N252T, N61R, N61T, N61Y, N62K, N62M, N67D, N67T, P137L, P13A, P13H, P13L, P13S, P154L, P154R, P154T, P180L, P180S, P185L, P185S, P185V, P194Q, P200A, P200L, P200S, P200T, P201A, P201L, P201R, P201S, P214T, P236L, P236T, P246L, P246Q, P249A, P249F, P249H, P249I, P249X, P30L, P30S, P42L, P83A, Q103K, Q135S, Q136N, Q157R, Q157S, Q221A, Q221R, Q248F, Q248L, Q248S, Q254A, Q254K, Q28S, Q53H, Q53K, Q53N, Q74R, Q92H, Q92S, R181H, R181S, R181V, R226H, R226P, R226V, R245A, R253G, R253Q, R27A, R58G, R89D, R89F, R89I, R89X, R89Y, S105L, S105Q, S151A, S151I, S151Q, S165F, S165P, S172E, S172V, S187I, S187P, S196H, S196L, S216A, S216Q, S218A, S218Q, S219A, S219Q, S258F, S258P, S29C, S29P, S43P, S43T, S48L, S50P, S56F, S56N, S56P, S56X, S73L, S73N, S73X, S99H, T108L, T125I, T125P, T168K, T168N, T168Q, T176H, T176L, T192D, T192F, T192I, T192N, T192P, T192X, T198D, T198I, T198P, T199A, T199H, T199P, T207D, T207I, T207P, T207S, T35I, T35L, T37Q, T55L, T87L, V109M, V109W, V121F, V134C, V134F, V142F, V149G, V149L, V159L, V159S, V160C, V160L, V162A, V162C, V206*, V206C, V206M, V210C, V217L, V217R, V217S, V222A, V222C, V222G, V241G, V241W, V241X, V31L, V49F, V68L, V68W, V78C, W123G, W123R, W16G, W191*, W191G, W191L, W208G, W208L, W208S, W244*, W244G, W244L, W97C, W97G, Y114H, Y114M, Y127M, Y190*, Y190L, Y190T, Y193C, Y193F, Y193I, Y193L, Y193T, Y193V, Y193X, Y40M, Y51F, Y51M, Y51T, Y51X, Y88T, K9N, S29A, но не ограничиваясь ими.

[0113] В одном аспекте SRE может быть выбран, без ограничения, из CA2 (ак 2-260 ДТ, R27L, H122Y), CA2 (ак 2-260 ДТ, T87I, H122Y), CA2 (ак 2-260 ДТ, H122Y, N252D), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, V241F), CA2 (ак 2-260 ДТ, V241F, P249L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71L, L250R), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249F), CA2 (ак 2-260 ДТ, T55K, G63N, Q248N), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, A257del, S258del, F259del, K260del), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, S2del, H3del, H4del, W5del), CA2 (ак 2-260 ДТ, W4Y, L156H), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, G234del, E235del, P236del), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, F225L), CA2 (ак 2-260 ДТ, D70N, D74N, D100N, L156H), (CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, G102R)(SEQ ID NO: 210598), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D,

E69V, N231I)(SEQ ID NO. 210748), CA2 (ак 2-260 ДТ, R27L, T87I, H122Y, N252D)(SEQ ID NO. 210702), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, V241F, P249L)(SEQ ID NO. 210503), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71L, T87N, L250R)(SEQ ID NO. 210510), CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, S172C, F178Y, E186D)(SEQ ID NO. 210756), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71F, N231F)(SEQ ID NO. 210505), CA2 (ак 2-260 ДТ, A77I, P249F)(SEQ ID NO. 210514), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, P249H)(SEQ ID NO. 210516), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249H)(SEQ ID NO. 210518), CA2 (ак 2-260 ДТ, Q53N, N61Y)(SEQ ID NO. 210521), CA2 (ак 2-260 ДТ, E106D, C205S)(SEQ ID NO. 210523), CA2 (ак 2-260 ДТ, C205S, W208S)(SEQ ID NO. 210525), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73N, R89Y)(SEQ ID NO. 210532), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, T192F)(SEQ ID NO. 210534), CA2 (ак 2-260 ДТ, Y193L, K260L)(SEQ ID NO. 210540), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71F, V241F, P249L)(SEQ ID NO. 210544), CA2 (ак 2-260 ДТ, L147F, Q248F)(SEQ ID NO. 210548), CA2 (ак 2-260 ДТ, D52I, S258P)(SEQ ID NO. 210550), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72S, T192N)(SEQ ID NO. 210552), CA2 (ак 2-260 ДТ, D179E, T192I)(SEQ ID NO. 210554), CA2 (ак 2-260 ДТ, S56N, Q103K)(SEQ ID NO. 210558), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71Y, Q248L)(SEQ ID NO. 210560), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73N, R89F)(SEQ ID NO. 210562), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, N231L, E235G, L239F)(SEQ ID NO. 210564), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, P249I)(SEQ ID NO. 210568), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72X, V241X, P249X)(SEQ ID NO. 210572), CA2 (ак 2-260 ДТ, A54X, S56X, L57X, T192X)(SEQ ID NO. 210574), CA2 (ак 2-260 ДТ, Y193V, K260F)(SEQ ID NO. 210576), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, M240L)(SEQ ID NO. 210578), CA2 (ак 2-260 ДТ, V134F, L228F)(SEQ ID NO. 210580), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71G, N231K)(SEQ ID NO. 210582), CA2 (ак 2-260 ДТ, S56F, D71S)(SEQ ID NO. 210584), CA2 (ак 2-260 ДТ, D52L, G128R, Q248F)(SEQ ID NO. 210586), CA2 (ак 2-260 ДТ, S73X, R89X)(SEQ ID NO. 210588), CA2 (ак 2-260 ДТ, Y51X, D72X, V241X, P249X)(SEQ ID NO. 210592), CA2 (ак 2-260 ДТ, D72I, W97C)(SEQ ID NO. 210594), CA2 (ак 2-260 ДТ, D71K, T192F, N231F)(SEQ ID NO. 210596), CA2 (ак 2-260 ДТ, H36Q, S43T, Y51F, N67D, G131W, R226H)(SEQ ID NO. 210698), CA2 (ак 2-260 ДТ, F70I, F146V)(SEQ ID NO. 210700), CA2 (ак 2-260 ДТ, K45N, V68L, H119Y, K169R, D179E)(SEQ ID NO. 210704), CA2 (ак 2-260 ДТ, H15L, A54V, K111E, E220K, F225I)(SEQ ID NO. 210706), CA2 (ак 2-260 ДТ, P13S, P83A, D101G, K111N, F230I)(SEQ ID NO. 210708), CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, W123R, E220K)(SEQ ID NO. 210712), CA2 (ак 2-260 ДТ, N11D, E69K, G86D, V109M, K113I, T125I, D138G, G155S)(SEQ ID NO. 210714), CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, G102R, A173T)(SEQ ID NO. 210716), CA2 (ак 2-260 ДТ, L79F, P180S)(SEQ ID NO. 210718), CA2 (ак 2-260 ДТ, A77P, G102R, D138N)(SEQ ID NO. 210724), CA2 (ак 2-260 ДТ, F20L, K45N, G63D, E69V, N231I)(SEQ ID NO. 210726), CA2 (ак 2-260 ДТ, T199N, L202P, L228F)(SEQ ID NO. 210728), CA2 (ак 2-260 ДТ, K9N, H122Y, T168K)(SEQ ID NO. 210730), CA2 (ак 2-260 ДТ, Q53H, L90V, Q92H, G131E)(SEQ ID NO. 210732), CA2 (ак 2-260 ДТ, L44M, L47V, N62K, E69D)(SEQ ID NO. 210734), CA2 (ак 2-260 ДТ, D75V, K169N, F259L)(SEQ ID NO. 210738), CA2 (ак 2-260 ДТ, T207S, V222A, N231D)(SEQ ID NO. 210740), CA2 (ак 2-260 ДТ, I59F, V206M, G232R)(SEQ ID NO. 210742), CA2 (ак 2-260 ДТ, P13A, A133T)(SEQ ID NO. 210744), CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, R89I)(SEQ ID NO. 210750), CA2 (ак 2-260 ДТ, A65N, G86D, G131R, G155D, K158N, V162A, G170D, P236L)(SEQ ID NO. 210752), CA2 (ак 2-260 ДТ, G12R, H15Y, D19V)(SEQ ID NO. 210754), CA2 (ак 2-260 ДТ, A65V, F95Y, E106G, H107Q, I145M, F175I)(SEQ ID NO. 210758) и/или CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, E69V, N231I)(SEQ ID NO. 210851 или 210847).

[0114] Система биоцикла, описанная в настоящем документе, может включать SRE, которые отвечают на один или более стимулов.

[0115] В некоторых вариантах осуществления стимул может представляет собой низкомолекулярное соединение, при этом низкомолекулярное соединение представляет собой целекоксиб, вальдекоксиб, рофекоксиб, ацетазоламид, метазоламид, дорзоламид, бринзоламид, диклофенамид, этоксзоламид,

зонисамид, дансиламид и дихлорфенамид. В одном из вариантов осуществления низкомолекулярное соединение может представлять собой ацетазоламид.

[0116] Также в настоящем документе описаны векторы, кодирующие системы биоциклов, и фармацевтические композиции, содержащие системы биоциклов и фармацевтически приемлемые эксципиенты.

Полезная нагрузка

[0117] В данном документе термин «полезная нагрузка», «целевая полезная нагрузка» или «представляющая интерес полезная нагрузка (POI)» определяется как любой белок или нуклеиновая кислота, функция которых должна быть изменена.

[0118] Полезная нагрузка может включать любой кодирующий или некодирующий ген или любой белок или его фрагмент.

[0119] Полезная нагрузка часто связана с одним или более SRE и может быть закодирована отдельно или в комбинации с одним или более SRE в полинуклеотиде по настоящему изобретению. Сами полезные нагрузки могут быть изменены (на уровне белка или нуклеиновой кислоты), обеспечивая тем самым дополнительный уровень устойчивости эффекторного модуля. Например, полезные нагрузки могут быть разработаны или сконструированы таким образом, чтобы содержать мутации, одиночные или множественные, которые влияют на стабильность полезной нагрузки или ее восприимчивость к деградации, расщеплению или транспортировке. Комбинация SRE, который может иметь спектр ответов на стимул, с полезной нагрузкой, которая изменяется для проявления различных ответов или градаций выходных сигналов, например, уровней экспрессии, создает биоциклы, которые превосходят аналогичные в данной области. Например, мутации или замещающие конструкции, такие как созданные для IL12 в WO 2016048903 (в частности, в Примере 1), содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме, могут быть использованы в любой белковой полезной нагрузке в сочетании с SRE по настоящему изобретению для создания двойных настраиваемых биоциклов. Возможность независимой настройки как SRE, так и полезной нагрузки значительно расширяет область применения эффекторных модулей по настоящему изобретению.

[0120] Искусственные пептиды или полипептидные компоненты полезной нагрузки могут быть получены из любого известного полипептида, не встречающегося в природе.

[0121] Как используется в настоящем документе, фраза «получен из» применительно к эффекторным модулям, SRE или полезным нагрузкам означает, что эффекторный модуль, SRE или полезная нагрузка происходят по меньшей мере частично от указанной родительской молекулы или последовательности. Например, при конструировании SRE, такой SRE может быть получен из эпитопа или области встречающегося в природе белка, но затем модифицирован любым из способов, описанных в настоящем документе, для оптимизации функции SRE.

[0122] В одном варианте осуществления полезная нагрузка получена из области родительского белка или из мутантного белка. Область родительского белка может составлять 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110,

111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450 или более 450 аминокислот в длину. Область родительского белка может составлять 5-50, 25-75, 50-100, 75-125, 100-150, 125-175, 150-200, 175-225, 200-250, 225-275, 250-300, 275-325, 300-350, 325-375, 350-400, 375-425 или 400-450 аминокислот в длину.

[0123] В одном варианте осуществления полезная нагрузка получена из области родительского белка или из мутантного белка и включает область родительского белка. Полезная нагрузка может включать область родительского белка, которая составляет 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100%, 5-10%, 10-15%, 15-20%, 20-25%, 25-30%, 30-35%, 35-40%, 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-100%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90%, 90-100%, 10-30%, 20-40%, 30-50%, 40-60%, 50-70%, 60-80%, 70-90%, 80-100%, 10-40%, 20-50%, 30-60%, 40-70%, 50-80%, 60-90%, 70-100%, 10-50%, 20-60%, 30-70%, 40-80%, 50-90%, 60-100%, 10-60%, 20-70%, 30-80%, 40-90%, 50-100%, 10-70%, 20-80%, 30-90%, 40-100%, 10-80%, 20-90%, 30-100%, 10-90%, 20-100%, 25-50%, 50-75% или 75-100% от родительского белка или мутантного белка.

[0124] В одном варианте осуществления полезная нагрузка получена из родительского белка или из мутантного белка и может иметь 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100%, 5-10%, 10-15%, 15-20%, 20-25%, 25-30%, 30-35%, 35-40%, 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-100%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90%, 90-100%, 10-30%, 20-40%, 30-50%, 40-60%, 50-70%, 60-80%, 70-90%, 80-100%, 10-40%, 20-50%, 30-60%, 40-70%, 50-80%, 60-90%, 70-100%, 10-50%, 20-60%, 30-70%, 40-80%, 50-90%, 60-100%, 10-60%, 20-70%, 30-80%, 40-90%, 50-100%, 10-70%, 20-80%, 30-90%, 40-100%, 10-80%, 20-90%, 30-100%, 10-90%, 20-100%, 25-50%, 50-75% или 75-100% идентичности с родительским белком или мутантным белком.

[0125] В одном варианте осуществления область трансмембранного домена первой полезной нагрузки может быть заменена трансмембранным доменом, его вариантом или фрагментом из второго родительского белка.

Полипептиды и полипептиды в качестве полезной нагрузки

[0126] Стимулы, компоненты биоцикла, эффекторные модули, включая их SRE и полезные нагрузки по настоящему изобретению могут существовать в виде целого полипептида, множества полипептидов или фрагментов полипептидов, которые независимо могут быть закодированы одной или более нуклеиновыми кислотами, множеством нуклеиновых кислот, фрагментами нуклеиновых кислот или вариантами любого из вышеупомянутых.

[0127] Как используется в настоящем документе, термин «полипептид» относится к полимеру аминокислотных остатков (природных или неприродных), соединенных между собой чаще всего пептидными связями. Термин, как он используется в настоящем документе, относится к белкам, полипептидам и пептидам любого размера, структуры или функции. В некоторых случаях размер кодируемого полипептида меньше, чем около 50 аминокислот, и тогда полипептид называется пептидом. Если полипептид является пептидом, то его длина будет составлять по меньшей мере около 2, 3, 4 или по меньшей мере 5 аминокислотных остатков. Таким образом, полипептиды включают продукты генов, встречающиеся в природе полипептиды, синтетические полипептиды, гомологи, ортологи, паралоги, фрагменты и другие эквиваленты, варианты и аналоги вышеперечисленного. Полипептид может представлять собой одну молекулу или может представлять собой мультимолекулярный комплекс, такой как димер, тример или тетрамер. Они также могут состоять из одноцепочечных или многоцепочечных полипептидов и могут быть ассоциированными или связанными. Термин полипептид может также применяться к аминокислотным полимерам, в которых один или более аминокислотных остатков являются искусственным химическим аналогом соответствующей встречающейся в природе аминокислоты.

[0128] Как используется в настоящем документе, термин «вариант полипептида» относится к молекулам, которые отличаются по своей аминокислотной последовательности от нативной или эталонной последовательности. Варианты аминокислотной последовательности могут иметь замены, делеции и/или вставки в определенных положениях в аминокислотной последовательности по сравнению с нативной или эталонной последовательностью. Как правило, варианты обладают по меньшей мере около 50% идентичностью (гомологией) к нативной или эталонной последовательности, и предпочтительно, они будут по меньшей мере на около 80%, более предпочтительно по меньшей мере на около 90% идентичны (гомологичны) нативной или эталонной последовательности.

[0129] В некоторых вариантах осуществления предложены «имитаторы вариантов». Как используется в настоящем документе, термин «имитатор варианта» относится к варианту, который содержит одну или более аминокислот, которые имитируют активированную последовательность. Например, глутамат может служить имитатором фосфотреонина и/или фосфосерина. Альтернативно, имитаторы вариантов могут приводить к деактивации или получению инактивированного продукта, содержащего имитатор, например, фенилаланин может выступать в качестве инактивирующей замены тирозина; или аланин может выступать в качестве инактивирующей замены серина. Аминокислотные последовательности фармацевтических композиций, биоциклов, компонентов биоциклов, эффекторных модулей, включая их SRE, или полезной нагрузки по настоящему изобретению могут включать встречающиеся в природе аминокислоты и как таковые могут рассматриваться как белки, пептиды, полипептиды или их фрагменты. Альтернативно, фармацевтические композиции, биоциклы, компоненты биоциклов, эффекторные модули, включая их SRE, или полезные нагрузки могут включать как встречающиеся и не встречающиеся в природе аминокислоты.

[0130] Как используется в настоящем документе, термин «вариант аминокислотной последовательности» относится к молекулам с некоторыми различиями в их аминокислотных последовательностях по сравнению с нативной или исходной последовательностью. Варианты аминокислотной последовательности могут иметь замены, делеции и/или вставки в определенных положениях в аминокислотной последовательности. Как используется в данном документе, термины «нативная» или «исходная», когда речь идет о последовательностях, являются относительными терминами, относящимися к исходной молекуле, с которой может быть проведено сравнение. Нативные или исходные последовательности не следует путать с последовательностями дикого типа. Нативные последовательности или молекулы могут представлять дикий тип (последовательность, встречающуюся в природе), но не обязательно должны быть идентичны последовательности дикого типа.

[0131] Как правило, варианты обладают по меньшей мере около 70% гомологией к нативной последовательности, и предпочтительно, они будут по меньшей мере на около 80%, более предпочтительно по меньшей мере на около 90% гомологичны нативной последовательности.

[0132] Как используется в настоящем документе, термин «гомология» применительно к аминокислотным последовательностям определяется как процент остатков в потенциальной аминокислотной последовательности, которые идентичны остаткам в аминокислотной последовательности второй последовательности после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если необходимо, для достижения максимального процента гомологии. Способы и компьютерные программы для выравнивания хорошо известны в данной области. Подразумевается, что гомология зависит от расчета процента идентичности, но может отличаться по значению из-за гэпов и штрафов, введенных в расчет.

[0133] Как используется в настоящем документе, термин «гомолог» применительно к аминокислотным последовательностям означает соответствующую последовательность другого вида, имеющую существенную идентичность со второй последовательностью второго вида.

[0134] Подразумевается, что используемый в настоящем документе термин «аналог» включает варианты полипептидов, которые отличаются одним или более аминокислотными изменениями, например, заменами, добавлениями или удалениями аминокислотных остатков, которые сохраняют свойства родительского полипептида.

[0135] Как используется в настоящем документе, термин «производное» используется как синоним термина «вариант» и относится к молекуле, которая была модифицирована или изменена каким-либо образом по сравнению с эталонной или исходной молекулой.

[0136] В настоящем изобретении рассматриваются несколько типов фармацевтических композиций, биоциклов, компонентов биоциклов, эффекторных модулей, включая их SRE или полезные нагрузки, которые основаны на аминокислотах, включая варианты и производные. К ним относятся варианты и производные с заменами, вставками, делециями и ковалентные варианты и производные. Таким образом, в объем настоящего изобретения входят фармацевтические композиции, биоциклы, компоненты биоциклов, эффекторные модули, включая их SRE или полезные нагрузки, включающие замены, вставки, добавления, делеции и/или ковалентные модификации. Например, метки последовательности или аминокислоты, такие как один или более лизинов, могут быть добавлены к пептидным последовательностям по данному изобретению (например, на N-конце или C-конце). Метки последовательностей можно использовать для очистки или

локализации пептидов. Лизины можно использовать для повышения растворимости пептидов или для биотинилирования. Альтернативно, аминокислотные остатки, расположенные в карбокси и аминоконцевых областях аминокислотной последовательности пептида или белка, необязательно могут быть удалены, что обеспечивает образование усеченных последовательностей. Определенные аминокислоты (например, С-концевые или N-концевые остатки) могут быть альтернативно удалены в зависимости от применения последовательности, как, например, экспрессия последовательности в качестве части более крупной последовательности, которая является растворимой или связанной с твердой подложкой.

[0137] «Замещающие варианты» по отношению к белкам представляют собой варианты, у которых удален по меньшей мере один аминокислотный остаток в нативной или исходной последовательности и на его место в том же положении вставленадругая аминокислота. Замены могут быть одиночными, когда была заменена только одна аминокислота в молекуле, или они могут быть множественными, когда две или более аминокислоты были заменены в одной и той же молекуле.

[0138] В контексте данного документа термин «консервативная аминокислотная замена» относится к замене аминокислоты, которая обычно присутствует в последовательности, другой аминокислотой аналогичного размера, заряда или полярности. Примеры консервативных замен включают замену неполярного (гидрофобного) остатка, такого как изолейцин, валин и лейцин, на другой неполярный остаток. Аналогичным образом, примеры консервативных замен включают замену одного полярного (гидрофильного) остатка на другой, например, между аргинином и лизином, между глутамином и аспарагином и между глицином и серином. Кроме того, замена основного остатка, такого как лизин, аргинин или гистидин, другим или замена одного кислотного остатка, такого как аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота, на другой кислотный остаток являются дополнительными примерами консервативных замен. Примеры неконсервативных замен включают замену неполярного (гидрофобного) аминокислотного остатка, такого как изолейцин, валин, лейцин, аланин, метионин, на полярный (гидрофильный) остаток, такой как цистеин, глутамин, глутаминовая кислота или лизин, и/или замену полярного остатка на неполярный остаток.

[0139] Как используется в настоящем документе, термин «инсерционные варианты» по отношению к белкам означает варианты, в которых одна или более аминокислот вставлены непосредственно рядом с аминокислотой в определенном положении в нативной или исходной последовательности. Как используется в настоящем документе, термин «непосредственно примыкают» относится к соседней аминокислоте, которая связана с альфа-карбокси- или альфа-аминофункциональной группой исходной или эталонной аминокислоты.

[0140] Как используется в настоящем документе, термин «варианты с делецией» по отношению к белкам означает варианты, у которых удалены одна или более аминокислот в нативной или исходной аминокислотной последовательности. Как правило, варианты с делецией имеют одну или более аминокислот, удаленных в определенной области молекулы.

[0141] Как используется в настоящем документе, термин «производные» включает варианты нативного или исходного белка, включающие одну или более модификаций с помощью органических белковых или небелковых дериватизирующих агентов, а также посттрансляционные модификации. Ковалентные модификации как правило вводят путем реакции целевых аминокислотных остатков белка с органическим дериватизирующим агентом, способным реагировать с выбранными боковыми цепями или терминальными остатками, или путем использования механизмов посттрансляционных модификаций, функционирующих в

выбранных рекомбинантных клетках-хозяевах. Полученные ковалентные производные применимы в программах, направленных на идентификацию остатков, важных для биологической активности, для иммуноанализа или для приготовления антител к белкам для иммуноаффинной очистки рекомбинантного гликопротеина. Такие модификации находятся в пределах понимая специалиста в данной области и выполняются без лишних экспериментов.

[0142] Как используется в настоящем документе, термин «сайт» применительно к вариантам осуществления на основе аминокислот используется как синоним к «аминокислотному остатку» и « аминокислотной боковой цепи». Сайт представляет собой положение в пептиде или полипептиде, которое может быть модифицировано, подвержено манипуляции, изменено, дериватизировано или варьировано в молекулах на основе полипептидов по настоящему изобретению.

[0143] Как используется в настоящем документе, термины «концы» или «конец» по отношению к белкам относится к концевой части пептида или полипептида. Такая концевая часть не ограничивается только первым или конечным сайтом пептида или полипептида, а может включать дополнительные аминокислоты в концевых областях. Молекулы на основе полипептидов по настоящему изобретению могут характеризоваться как имеющие N-конец (оканчивающийся аминокислотой со свободной аминогруппой (NH_2)) и C-конец (оканчивающийся аминокислотой со свободной карбоксильной группой (COOH)).

[0144] Полипептиды или белки по изобретению в некоторых случаях состоят из множества полипептидных цепей, соединенных вместе дисульфидными связями или нековалентными силами (мультимеры, олигомеры). Такие белки имеют несколько N- и C-концов. Альтернативно, концы полипептидов можно модифицировать таким образом, чтобы они начинались или заканчивались, в зависимости от конкретного случая, фрагментом на основе неполипептидов, таким как органический конъюгат.

[0145] После того как любой из признаков идентифицирован или определен как компонент компонента системы биоцикла, стимула, эффекторного модуля, включая SRE или полезные нагрузки по изобретению, можно выполнить любую из нескольких манипуляций и/или модификаций этих признаков путем перемещения, обмена, инвертирования, удаления, рандомизации или дублирования. Кроме того, понятно, что манипуляции с признаками могут привести к тому же результату, что и модификация композиций по изобретению. Например, манипуляция, включающая удаление домена, приведет к изменению длины молекулы, так же как и модификация нуклеиновой кислоты для кодирования меньшей молекулы чем была бы полноразмерная молекула.

[0146] Модификации и манипуляции могут быть осуществлены методами, известными в данной области, такими как сайт-направленный мутагенез. Полученные модифицированные молекулы могут быть проверены на активность с помощью анализов in vitro или in vivo, таких как описанные в настоящем документе, или любых других подходящих анализов, известных в данной области.

[0147] В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению могут содержать один или более атомов, которые являются изотопами. Как используется в настоящем документе, термин «изотоп» относится к химическому элементу, который имеет один или более дополнительных нейтронов. В некоторых вариантах осуществления соединения по настоящему изобретению могут быть дейтерированы. Как используется в настоящем документе, термин «дейтерирование» относится к процессу замены одного или более атомов водорода в веществе изотопами дейтерия. Изотопы дейтерия - это изотопы водорода. Ядро

водорода содержит один протон, а ядро дейтерия - и протон, и нейтрон. Фармацевтические композиции, биоциклы, компоненты биоциклов, эффекторные модули, включая их SRE или полезные нагрузки, по настоящему изобретению могут быть дейтерированы для изменения одного или более физических свойств, таких как стабильность, или для того, чтобы фармацевтические композиции, биоциклы, компоненты биоциклов, эффекторные модули, включая их SRE или полезные нагрузки, могли быть использованы в диагностических и/или экспериментальных применениях.

[0148] На уровне белка любой из компонентов биоцикла может включать одну или более посттрансляционных модификаций (ПТМ). Такие ПТМ могут происходить внутриклеточно после введения компонента биоцикла на основе белка или после трансляции компонента биоцикла, вводимого в виде нуклеиновой кислоты, кодирующей данный компонент биоцикла.

[0149] Посттрансляционные модификации (ПТМ) по настоящему изобретению включают ацетилирование, фосфорилирование, убиквитинирование, карбоксилирование, деамидирование, деаминирование, деацетилирование, дигидроксилирование, дефосфорилирование, формилирование, гамма-карбоксиглутатионирование, глутатионирование, гликирование, гидроксилирование, метилирование, нитрование, сумоилирование, N- или O-трансглутатионирование, гликозилирование и фарнезилирование, но не ограничиваются ими.

[0150] Эффекторные модули, включая их SRE и полезные нагрузки, могут независимо иметь 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более ПТМ, которые являются одинаковыми или разными.

[0151] Эффекторные модули могут быть сконструированы таким образом, чтобы включать один или более структурных или функциональных доменов, повторов или мотивов семейства белков. Такие домены, повторы и мотивы классифицируются по семействам белков; и репрезентативные семейства приведены в базе данных EMBL-EBI, расположенной по адресу http://www.ebi.ac.uk/.

[0152] В некоторых вариантах осуществления модификации белка, встроенные в структуру композиций по изобретению для вмешательства в процессинг антигена и процесс нагрузки пептида, такие как гликозилирование и ПЭГилирование, также могут быть применимы в настоящем изобретении. Композиции по изобретению также могут быть сконструированы так, чтобы включать неклассические аминокислотные боковые цепи для создания менее иммуногенных композиций. Любой из способов, рассмотренных в Международной патентной публикации № WO 2005051975 для снижения иммуногенности, может быть применим в настоящем изобретении (содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме).

[0153] SRE может быть пептидом, комплексом пептидов, комплексом пептид-белок, белком, слитым белком, комплексом белков, комплексом белок-белок, но не ограничивается ими. SRE может включать одну или более областей, полученных из любого природного или мутировавшего белка или антитела. В этом аспекте SRE является элементом, который, отвечая на стимул, может настраивать внутриклеточную локализацию, внутримолекулярную активацию и/или деградацию полезной нагрузки.

[0154] В некоторых вариантах осуществления эффекторные модули по настоящему изобретению могут включать дополнительные признаки, облегчающие экспрессию и регуляцию эффекторного модуля, такие как одна или более сигнальных последовательностей (СП), один или более сайтов расщепления и/или процессинга, один или более нацеливающих и/или проникающих пептидов, одна или более меток и/или один

или более линкеров. Кроме того, эффекторные модули по настоящему изобретению могут дополнительно включать другие регуляторные молекулы, такие как индуцибельные промоторы, энхансерные последовательности, сайты микроРНК и/или нацеливающие сайты микроРНК. Каждый аспект или настроенная модальность может привносить в эффекторный модуль или биоцикл дифференциально настроенный признак. Например, SRE может представлять собой дестабилизирующий домен, в то время как мутации в полезной нагрузке белка могут изменить его сайты расщепления, свойства димеризации или период полужизни, а включение одной или более микроРНК или сайта связывания микроРНК может обеспечить ненацеливание на клетки или особенности транспорта. Следовательно, настоящее изобретение охватывает биоциклы, которые являются многофакторными по своей устойчивости. Такие биоциклы могут быть сконструированы таким образом, чтобы содержать одну, две, три, четыре или более настроенных особенностей.

[0155] В некоторых вариантах осуществления эффекторные модули по настоящему изобретению могут включать один или более дегронов для настройки экспрессии. Как используется в настоящем документе, «дегрон» относится к минимальной последовательности в белке, достаточной для распознавания и разрушения протеолитической системой. Важным свойством дегронов является то, что они перемещаемые, то есть добавление дегрона к последовательности обеспечивает деградацию последовательности. В некоторых вариантах осуществления дегрон может быть добавлен к дестабилизирующим доменам, полезной нагрузке или к ним обоим. Встраивание дегрона в эффекторный модуль по изобретению обеспечивает дополнительную белковую нестабильность эффекторного модуля и может быть использовано для снижения исходной экспрессии. В некоторых вариантах осуществления дегрон может быть N-дегроном, фосфодегроном, термоиндуцируемым дегроном, фоточувствительным дегроном, кислородзависимым дегроном. В качестве неограничивающего примера дегрон может представлять собой дегрон орнитиндекарбоксилазы, как описано Takeuchi et al. (Takeuchi J et al. (2008). Biochem J. 2008 Mar 1; 410(2):401-7; содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки). Другие примеры дегронов, применимых в настоящем изобретении, включают дегроны, описанные в Международных патентных публикациях № WO 2017004022, WO 2016210343 и WO 2011062962; содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Иммунотерапевтические агенты

[0156] Биоциклы, описанные в настоящем документе, могут включать иммунотерапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления полезные нагрузки по настоящему изобретению могут быть иммунотерапевтическими агентами, которые вызывают иммунный ответ в организме. Иммунотерапевтический агент может представлять собой антитело и его фрагменты и варианты, химерный антигенный рецептор (CAR), химерный переключающий рецептор, цитокин, хемокин, рецептор цитокина, рецептор хемокина, слитый полипептид цитокин-цитокиновый рецептор или любой агент, вызывающий иммунный ответ, но не ограничивается ими. В одном варианте осуществления иммунотерапевтический агент вызывает противораковый иммунный ответ в клетке или у субъекта.

Цитокины, хемокины и другие факторы

[0157] В соответствии с настоящим изобретением, полезные нагрузки по настоящему изобретению могут представлять собой цитокины, хемокины, факторы роста и растворимые белки, вырабатываемые иммунными клетками, раковыми клетками и другими типами клеток, которые действуют как химические коммуникаторы

между клетками и тканями внутри организма. Эти белки опосредуют широкий спектр физиологических функций, от влияния на рост, дифференциацию, миграцию и выживание клеток до ряда эффекторных функций. Например, активированные Т-клетки вырабатывают различные цитокины для цитотоксической функции, чтобы уничтожить опухолевые клетки.

[0158] В некоторых вариантах осуществления полезные нагрузки по настоящему изобретению могут представлять собой цитокины, их фрагменты, варианты, аналоги и производные, включая интерлейкины, факторы некроза опухоли (TNF, англ.: tumor necrosis factors), интерфероны (ИФН), TGF бета и хемокины, но не ограничиваясь ими. Как известно из уровня техники, определенные номенклатуры генов и/или белков для одного и того же гена или белка могут включать или не включать знаки препинания, такие как тире "-", или символы, такие как греческие буквы. Независимо от того, включены они в настоящем документе или исключены из него, их значение не должно изменяться, что будет понятно специалисту в данной области. Например, IL2, IL2 и IL-2 относятся к одному и тому же интерлейкину. Аналогично, TNF альфа, TNFα, TNF-альфа, TNF-α, TNF альфа и TNF α обозначают один и тот же белок. Аналогично, CD40L, CD40 L и CD40LG относятся к одному и тому же белку.

[0159] В некоторых вариантах осуществления полезные нагрузки по настоящему изобретению могут представлять собой цитокины, стимулирующие иммунный ответ. В других вариантах осуществления полезные нагрузки по изобретению могут быть антагонистами цитокинов, которые негативно влияют на противораковые иммунные ответы.

[0160] В некоторых вариантах осуществления полезные нагрузки по настоящему изобретению могут представлять собой цитокиновые рецепторы, рекомбинантные рецепторы, их варианты, аналоги и производные; или сигнальные компоненты цитокинов.

[0161] В некоторых вариантах осуществления цитокины по настоящему изобретению могут быть использованы для улучшения размножения, выживаемости, персистенции и активности иммунных клеток, таких как CD8+TEM, естественные клетки-киллеры и инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL, англ.: tumor infiltrating lymphocytes), используемые для иммунотерапии. В других вариантах осуществления Т-клетки, сконструированные с двумя или более цитокинами, регулируемыми ДД, используются для обеспечения кинетического контроля активации Т-клеток и ремоделирования микроокружения опухоли. В одном аспекте, в настоящем изобретении предложены биоциклы и композиции для уменьшения токсичности, связанной с цитокиновой терапией. Несмотря на успех в уменьшении опухолевой нагрузки, системная цитокиновая терапия часто приводит к развитию тяжелых побочных эффектов, ограничивающих дозу. Два фактора способствуют наблюдаемой токсичности (а) плейотропизм, когда цитокины воздействуют на различные типы клеток и иногда оказывают противоположные эффекты на одни и те же клетки в зависимости от контекста (б) цитокины имеют короткий период полужизни в сыворотке крови, поэтому для достижения терапевтического эффекта их необходимо вводить в высоких дозах, что усугубляет плейотропные эффекты. В одном аспекте цитокины по настоящему изобретению могут быть использованы для модуляции экспрессии цитокинов в случае нежелательного явления. В некоторых вариантах осуществления цитокины по настоящему изобретению могут быть сконструированы таким образом, чтобы иметь увеличенную продолжительность жизни или повышенную специфичность для уменьшения токсичности.

[0162] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка по настоящему изобретению может быть цитокином интерлейкином (IL). Интерлейкины (IL) - это класс гликопротеинов, вырабатываемых лейкоцитами для регуляции иммунных ответов. Как используется в настоящем документе, термин «интерлейкин (IL)» относится к полипептиду интерлейкина из любого вида или источника и включает полноразмерный белок, а также фрагменты или части белка. В некоторых аспектах полезная нагрузка интерлейкина выбрана из IL1, IL1альфа (также называемого гемопоэтином-1), IL1бета (катаболический), IL1 дельта, IL1эпсилон, IL1эта, IL1 дзета, членов 1-11 семейства интерлейкина-1 (IL1F1-IL1F11), гомологов 1-4 интерлейкина-1 (IL1H1-IL1H4), белков 1-3, схожих с IL1 (IL1RP1-IL1RP3), IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL10C, IL10D, IL11, IL11a, IL11b, IL12, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL17A, Il17B, IL17C, IL17E, IL17F, IL18, IL19, IL20, IL20-подобного (IL20L), Il21, IL22, IL23, IL23A, IL23-p19, IL23-p40, IL24, Il25, IL26, IL27, IL28A, IL28B, IL29, IL30, IL31, IL32, IL33, IL34, IL35, IL36 альфа, IL36 бета, IL36 гамма, IL36RN, IL37, IL37a, IL37b, IL37c, IL37d, IL37e и IL38. В других аспектах полезная нагрузка по настоящему изобретению может представлять собой рецептор интерлейкина, выбранный из CD121a, CDw121b, IL2Rα/CD25, IL2Rβ/CD122, IL2Rγ/CD132, CDw131, CD124, CD131, CDw125, CD126, CD130, CD127, CDw210, IL8RA, IL11Rα, CD212, CD213α1, CD213α2, IL14R, IL15Rα, CDw217, IL18Rα, IL18Rβ, IL20Rα и IL20Rβ. В других аспектах полезная нагрузка по настоящему изобретению может быть членом суперсемейства TNF, включая, без ограничений, TNF альфа, CD40L, лимфотоксин (LTA) альфа, LTA бета и OX40L.

Антитела и фрагменты и варианты антител

[0163] Биоциклы, описанные в настоящем документе, могут включать одно или более антител, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления одно или более описанных в данном документе антител могут представлять собой полезную нагрузку.

[0164] В некоторых вариантах осуществления фрагменты и варианты антител могут содержать антигенсвязывающие области интактных антител. Примеры фрагментов и вариантов антител могут включать фрагменты Fab, Fab', F(ab')2 и Fv; диатела; линейные антитела; одноцепочечные молекулы антител, такие как одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv); и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител, но не ограничиваются ими. Фармацевтические композиции, биоциклы, компоненты биоциклов, эффекторные модули, включая их SRE, или полезные нагрузки по настоящему изобретению могут включать один или более из этих фрагментов.

[0165] Для целей, описанных в настоящем документе, «антитело» может содержать тяжелый и легкий вариабельный домен, а также Fc-область. Как используется в настоящем документе, термин «нативное антитело» обычно обозначает гетеротетрамерный гликопротеин массой около 150 000 дальтон, состоящий из двух одинаковых легких (L) цепей и двух одинаковых тяжелых (H) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь имеет на одном конце вариабельный домен (VH), за которым следует ряд константных доменов. Каждая легкая цепь имеет вариабельный домен на одном конце (VL) и константный домен на другом конце; константный домен легкой цепи выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи, а вариабельный домен легкой цепи выровнен с вариабельным доменом тяжелой цепи.

[0166] Как используется в настоящем документе, термин «вариабельный домен» относится к специфическим доменам антитела, расположенным на тяжелой и легкой цепях антитела, которые значительно различаются у разных антител и вносят вклад в связывание и специфичность каждого конкретного антитела

по отношению к его конкретному антигену. Вариабельные домены состоят из гипервариабельных областей. Как используется в настоящем документе, термин «гипервариабельная область» относится к области в вариабельном домене, включающей аминокислотные остатки, ответственные за связывание антигена. Аминокислоты, присутствующие в гипервариабельных областях, определяют структуру определяющих комплементарность областей (CDR), которые становятся частью антигенсвязывающего сайта антитела. Как используется в настоящем документе, термин «CDR» относится к области антитела, включающей структуру, которая комплиментарна его целевому антигену или эпитопу. Другие части вариабельного домена, не взаимодействующие с антигеном, называются каркасными (FW, англ.: framework) областями. Антигенсвязывающий сайт (также известный как антигенсвязывающий активный центр антитела или паратоп) включает аминокислотные остатки, необходимые для взаимодействия с конкретным антигеном.

[0167] Домены VH и VL имеют по три CDR. CDR VL упоминаются в настоящем документе как CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, в порядке появления при движении от N к C концу вдоль полипептида вариабельного домена. CDR VH упоминаются в настоящем документе как CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, в порядке появления при движении от N к C концу вдоль полипептида вариабельного домена.

[0168] Как используется в настоящем документе, термин «Fv» относится к фрагменту антитела, включающему минимальный фрагмент антитела, необходимый для формирования полного антигенсвязывающего сайта. Эти области состоят из димера одного вариабельного домена тяжелой цепи и одного вариабельного домена легкой цепи в плотной нековалентной ассоциации. Фрагменты Fv могут образовываться в результате протеолитического расщепления, но они в основном нестабильны. Из уровня техники известны рекомбинантные способы получения стабильных фрагментов Fv, обычно путем вставки гибкого линкера между вариабельным доменом легкой цепи и вариабельным доменом тяжелой цепи (для образования одноцепочечного Fv (scFv)) или путем введения дисульфидного мостика между вариабельными доменами тяжелой и легкой цепей (Strohl, W.R. Therapeutic Antibody Engineering. Woodhead Publishing, Philadelphia PA. 2012. Ch. 3, p46-47, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме).

[0169] Как используется в настоящем документе, термин «легкая цепь» относится к компоненту антитела любого вида позвоночных, отнесенному к одному из двух четко различающихся типов, называемых каппа и лямбда, на основании аминокислотных последовательностей константных доменов. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей антитела можно отнести к разным классам. Существует пять основных классов интактных антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA и IgA2.

[0170] Как используется в настоящем документе, термин «одноцепочечный Fv» или «scFv» относится к слитому белку доменов VH и VL антител, в котором эти домены соединены в одну полипептидную цепь гибким пептидным линкером. В некоторых вариантах осуществления полипептидный линкер Fv позволяет scFv формировать желаемую структуру для связывания с антигеном. В некоторых вариантах осуществления scFv используются в сочетании с фаговым дисплеем, дрожжевым дисплеем или другими методами дисплея, где они могут экспрессироваться в ассоциации с поверхностным членом (например, белком оболочки фага) и используется для идентификации высокоаффинных пептидов для данного антигена.

[0171] С помощью молекулярной генетики два scFv могут быть сконструированы в тандем в одном полипептиде, разделенном линкерным доменом, который называется «тандемный scFv» (tascFv). Конструирование tascFv с генами для двух различных scFv дает «биспецифические одноцепочечные вариабельные фрагменты» (bis-scFvs). Только два tascFv были клинически разработаны коммерческими фирмами; Оба препарата являются биспецифическими агентами, находящимися в активной ранней фазе разработки компании Micromet для онкологических показаний и описываются как «биспецифические активаторы Т-клеток (BiTE)». Блинатумомаб является анти-CD19/анти-CD3 биспецифическим tascFv, который потенцирует Т-клеточный ответ при В-клеточной неходжкинской лимфоме в фазе 2. MT110 является анти-EP-CAM/анти-CD3 биспецифическим tascFv, который потенцирует Т-клеточный ответ на солидные опухоли в фазе 1. Биспецифические, тетравалентные «TandAb» также исследуются компанией Affimed (Nelson, A. L., MAbs., 2010, Jan-Feb; 2(1):77-83). Макситела (бивалентные scFv, слитые с аминоконцом Fc (CH2-CH3 домены) IgG также могут быть включены.

[0172] Как используется в настоящем документе, термин «биспецифическое антитело» относится к антителу, способному связывать два различных антигена. Такие антитела, как правило, включают в себя области по меньшей мере двух различных антител. Биспецифические антитела могут включать любые из тех, которые описаны в Riethmuller, G. Cancer Immunity. 2012, 12:12-18, Marvin et al., 2005. Acta Pharmacologica Sinica. 2005, 26(6): 649- 658 и Schaefer et al. PNAS. 2011, 108(27):11187-11192, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[0173] Как используется в настоящем документе, термин «диатело» относится к небольшому фрагменту антитела с двумя антигенсвязывающими сайтами. Диатела являются функциональными биспецифическими одноцепочечными антителами (bscAb). Диатела состоят из вариабельного домена тяжелой цепи VH, соединенного с вариабельным доменом легкой цепи VL в одной полипептидной цепи. Вследствие использования линкера, который является слишком коротким, чтобы позволить объединение двух доменов в одной цепи, домены вынуждены объединяться с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антигенсвязывающих сайта.

[0174] Термин «интрателo» относится к форме антитела, которое не выделяется из клетки, в которой оно вырабатывается, а вместо этого нацелено на один или более внутриклеточных белков. Интратела могут использоваться для воздействия на множество клеточных процессов, включая, помимо прочего, внутриклеточную миграцию, транскрипцию, трансляцию, метаболические процессы, передачу сигнала пролиферации и деление клеток. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению могут включать терапию на основе интрател. В некоторых таких вариантах осуществления последовательности вариабельных доменов и/или CDR-последовательности, раскрытые в настоящем документе, могут быть включены в одну или более конструкций для терапии на основе интрател.

[0175] Как используется в настоящем документе, термин «моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из популяции практически однородных клеток (или клонов), т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны и/или связывают один и тот же эпитоп, за исключением возможных вариантов, которые могут возникнуть в процессе получения моноклональных антител, причем такие варианты обычно присутствуют в незначительных количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител,

которые обычно включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене.

[0176] Модификатор «моноклональное» указывает на характер антитела как полученного из по существу гомогенной популяции антител и не должен толковаться как требующий получения антитела каким-либо конкретным способом. Предложенные в данном документе моноклональные антитела включают «химерные» антитела (иммуноглобулин), в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных от конкретного вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, тогда как остаток цепи(ей) идентичен(ны) или гомологичен(ны) соответствующим последовательностям в антителах, полученных от другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител.

[0177] Как используется в настоящем документе, термин «гуманизированное антитело» относится к химерному антителу, включающему минимальную часть из одного или более нечеловеческих (например, мышиных) антител с остальной частью, полученной из одного или более иммуноглобулинов человека. В большинстве случаев гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (антитело-реципиент), в которых остатки гипервариабельной области антитела-реципиента заменены остатками гипервариабельной области антитела видов, отличных от человека (антитело-донор), таких как мышь, крыса, кролик или примат, не являющийся человеком, обладающими желаемой специфичностью, аффинностью и/или способностью. В одном варианте осуществления антитело может быть гуманизированным полноразмерным антителом. В качестве неограничивающего примера, антитело может быть гуманизировано с помощью методов, описанных в патентной публикации США № US 20130303399, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[0178] Как используется в настоящем документе, термин «вариант антитела» относится к модифицированному антителу (по отношению к нативному или исходному антителу) или биомолекуле, напоминающей нативное или исходное антитело по структуре и/или функции (например, миметик антитела). Варианты антител могут быть изменены в своей аминокислотной последовательности, составе или структуре по сравнению с нативным антителом. Варианты антител могут включать антитела с измененными изотипами (например, IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или IgM), гуманизированные варианты, оптимизированные варианты, мультиспецифические варианты антител (например, биспецифические варианты) и фрагменты антител, но не ограничиваться ими.

[0179] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, биоциклы, компоненты биоциклов, эффекторные модули, включая их SRE, или полезные нагрузки по настоящему изобретению могут быть миметиками антитела. Как используется в настоящем документе, термин « миметик антитела» относится к любой молекуле, которая имитирует функцию или действие антитела и которая специфически и с высокой аффинностью связывается с их молекулярными мишенями. В некоторых вариантах осуществления миметики антител могут быть монотелами, сконструированными таким образом, чтобы включать домен фибронектина типа III (Fn3) в качестве белкового каркаса (US 6673901; US 6348584). В некоторых вариантах осуществления миметики антител могут быть известными в данной области пептидами, включая молекулы аффитела, афилины, аффитины, антикалины, авимеры, центирины, DARPinsTM, финомеры и домены Кунитца, но не ограничиваясь ими. В других вариантах осуществления миметики антител могут включать одну или более непептидных областей.

[0180] В одном варианте осуществления антитело может содержать модифицированную Fc-область. В качестве неограничивающего примера, модифицированная Fc-область может быть получена с помощью способов или может быть любой из областей, описанных в патентной публикации США № US 20150065690, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[0181] В некоторых вариантах осуществления полезные нагрузки по изобретению могут кодировать мультиспецифические антитела, которые связывают более одного эпитопа. Как используется в настоящем документе, термины «мультитело» или «мультиспецифическое антитело» относятся к антителу, в котором две или более вариабельных областей связываются с различными эпитопами. Эпитопы могут находиться на одной и той же или разных мишенях. В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело может быть получено и оптимизировано способами, описанными в Международной патентной публикации № WO 2011109726 и патентной публикация США № US 20150252119, содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Эти антитела способны связываться с несколькими антигенами с высокой специфичностью и высокой аффинностью.

[0182] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой «биспецифическое антитело», которое распознает два разных эпитопа на одном и том же или разных антигенах. В одном аспекте биспецифические антитела способны связывать два различных антигена. Такие антитела, как правило, включают в себя антигенсвязывающие области по меньшей мере двух различных антител. Например, биспецифическое моноклональное антитело (BsMAb, BsAb) - это искусственный белок, состоящий из фрагментов двух различных моноклональных антител, что позволяет BsAb связываться с двумя различными типами антигенов. Каркасы биспецифических антител могут включать любой из тех, которые описаны в Riethmuller, G., 2012. Cancer Immunity, 2012, 12:12-18; Marvin et al., Acta Pharmacologica Sinica. 2005, 26(6):649-658; и Schaefer et al., PNAS. 2011, 108(27): 11187-11192, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Были разработаны новые поколения BsMAb, называемые «трифункциональными биспецифическими» антителами. Они состоят из двух тяжелых и двух легких цепей, по одной от двух разных антител, при этом две Fab-области (плечи) направлены против двух антигенов, а Fc-область (основа) включает две тяжелые цепи и образует третий сайт связывания.

[0183] В некоторых вариантах осуществления полезные нагрузки могут кодировать антитела, содержащие один антигенсвязывающий домен. Эти молекулы чрезвычайно малы, их молекулярная масса составляет примерно одну десятую от той, которая наблюдается у полноразмерных mAb. Другие антитела могут включать «нанотела», полученные из антигенсвязывающих вариабельных областей тяжелой цепи (VHH) антител, состоящих только из тяжелых цепей, обнаруженных у верблюдов и лам, у которых отсутствуют легкие цепи (Nelson, A. L., MAbs.2010. Jan-Feb; 2(1):77–83).

[0184] В некоторых вариантах осуществления антитело может быть «миниатюризированным». Среди лучших примеров миниатюризации mAb - небольшие модульные иммунофармацевтические препараты (SMIP, англ.: small modular immunopharmaceutical) компании Trubion Pharmaceuticals. Эти молекулы, которые могут быть моновалентными или бивалентными, представляют собой рекомбинантные одноцепочечные молекулы, содержащие один антигенсвязывающий домен VL, один антигенсвязывающий домен VH и один или два постоянных «эффекторных» домена, соединенных линкерными доменами. Предположительно, такая молекула могла бы обеспечить преимущества повышенной проницаемости в ткани или опухоли, на которые

претендуют фрагменты, сохраняя при этом эффекторные иммунные функции, обеспечиваемые константными доменами. По крайней мере, три «миниатюризированных» SMIP вошли в клиническую разработку.

[0185] Один из примеров миниатюризированных антител называется «унитело», в котором из молекул IgG4 удалена шарнирная область. Хотя молекулы IgG4 нестабильны и могут обмениваться друг с другом гетеродимерами легкой и тяжелой цепей, удаление шарнирной области полностью предотвращает спаривание тяжелой цепи с тяжелой цепью, оставляя высокоспецифичные моновалентные гетеродимеры легкой и тяжелой цепей, сохраняя при этом Fc-область для обеспечения стабильности и периода полужизни in vivo.

[0186] В некоторых вариантах осуществления полезные нагрузки по изобретению могут кодировать однодоменные антитела (sdAb, или нанотела), которые представляют собой фрагмент антитела, состоящий из одного мономерного вариабельного домена антитела. Как и полное антитело, оно способно избирательно связываться со специфическим антигеном. В одном аспекте, sdAb может быть «Ig верблюда» или «VHH верблюдовых». Как используется в настоящем документе, термин «Ig верблюда» относится к наименьшей известной антигенсвязывающей единице антитела с тяжелой цепью (Koch-No lte, et al, FASEB J., 2007, 21: 3490-3498). Антитело «состоящее только из тяжелой цепи» или «антитело верблюдовых» относится к антителу, которое содержит два домена VH и не содержит легких цепей (Riechmann L. et al, J. Immunol. Methods, 1999, 231: 25-38; Международные патентные публикации № WO 1994/04678 и WO 1994/025591, и патент США № 6005079). В другом аспекте sdAb может быть «рецептором нового антигена иммуноглобулина» (IgNAR). Как используется в настоящем документе, термин «рецептор нового антигена иммуноглобулина» относится к классу антител из иммунного репертуара акул, которые состоят из гомодимеров одного вариабельного домена рецептора нового антигена (VNAR) и пяти константных доменов рецептора нового антигена (CNAR).

[0187] В некоторых вариантах осуществления полезные нагрузки по изобретению могут кодировать интрателo. Интратела - это форма антител, которые не выделяются из клетки, в которой они вырабатываются, а нацелены на один или более внутриклеточных белков. Интратела экспрессируются и функционируют внутриклеточно и могут использоваться для воздействия на множество клеточных процессов, включая, помимо прочего, внутриклеточную миграцию, транскрипцию, трансляцию, метаболические процессы, передачу сигнала пролиферации и деление клеток. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе способы могут включать терапию на основе интрател. В некоторых таких вариантах осуществления последовательности вариабельных доменов и/или CDR-последовательности, раскрытые в настоящем документе, включены в одну или более конструкций для терапии на основе интрател. Например, интратела могут быть нацелены на один или более гликированных внутриклеточных белков или могут модулировать взаимодействие между одним или более гликированными внутриклеточными белками и альтернативным белком.

[0188] В некоторых аспектах полезные нагрузки по изобретению могут кодировать биосинтетические антитела, как описано в патенте США № 5091513, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Такое антитело может включать одну или более последовательностей аминокислот, составляющих область, которая ведет себя как биосинтетический связывающий сайт антитела (BABS). Сайты содержат 1) нековалентно связанные или дисульфидно связанные синтетические димеры VH и VL, 2) одиночные цепи VH-VL или VL-VH, при этом VH и VL соединены полипептидным линкером, или 3) отдельные домены VH или VL. Связывающие домены содержат связанные CDR и области FR, которые

могут быть получены из отдельных иммуноглобулинов. Биосинтетические антитела могут также включать другие полипептидные последовательности, которые функционируют, например, как фермент, токсин, связывающий сайт или сайт прикрепления к иммобилизационному носителю или радиоактивному атому. Описаны способы получения биосинтетических антител, конструирования BABS, обладающих любой специфичностью, которая может быть вызвана получением антитела in vivo, и получения их аналогов.

[0189] В некоторых вариантах осуществления полезные нагрузки могут кодировать антитела с акцепторными каркасами антител, описанными в патенте США № 8399625. Такие акцепторные каркасы антител могут особенно хорошо подходить для приема CDR от представляющего интерес антитела.

[0190] В одном варианте осуществления антитело может быть условно активным белковым биологическим препаратом. Предложено антитело, которое может быть использовано для создания условно активного белкового биологического препарата, который обратимо или необратимо инактивируется при нормальных физиологических условиях/условиях дикого типа, а также такой условно активный белковый биологический препарат и применение условно активного белкового биологического препарата. Такие способы и условно активные белки описаны, например, в Международных публикациях № WO 2015175375 и WO 2016036916, и патентной публикации США № US 20140378660, содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Антитела, используемые для иммунотерапии

[0191] В некоторых вариантах осуществления полезные нагрузки по настоящему изобретению могут представлять собой антитела, их фрагменты и варианты, которые специфичны к опухолеспецифическим антигенам (TSA) и опухолеассоциированным антигенам (TAA). Антитела циркулируют по всему организму, пока не найдут и не прикрепятся к TSA/TAA. Прикрепившись, они привлекают другие части иммунной системы, усиливая ADCC (антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность) и ADCP (антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз) для уничтожения опухолевых клеток. Как используется в настоящем документе, термин «опухолеспецифический антиген (TSA)» означает антигенное вещество, вырабатываемое в опухолевых клетках, которое может вызвать противоопухолевый иммунный ответ в организме хозяина. В одном варианте осуществления TSA может быть опухолевым неоантигеном. Антитело, специфичное к опухолевому антигену, опосредует комплемент-зависимый цитотоксический ответ против опухолевых клеток, экспрессирующих тот же антиген.

[0192] В некоторых вариантах осуществления опухолеспецифические антигены (TSA), опухолеассоциированные антигены (TAA), патогенассоциированные антигены или их фрагменты могут быть экспрессированы в виде пептида или интактного белка, или его части. Интактный белок или его часть может быть нативным или мутагенизированным. Антигены, ассоциированные с раковыми заболеваниями или раковыми заболеваниями, вызванными вирусами, как описано в настоящем документе, хорошо известны в данной области. Такие TSA или Так могут быть ранее связаны с раком или могут быть идентифицированы любым способом, известным в данной области.

[0193] В одном варианте осуществления антиген представляет собой CD19, В-клеточный поверхностный белок, экспрессируемый на протяжении всего развития В-клеток. CD19 является хорошо известной В-клеточной поверхностной молекулой, которая при активации В-клеточного рецептора усиливает индуцированную В-клеточным антигенным рецептором передачу сигнала и размножение популяций В-

клеток. CD19 широко экспрессируется как в нормальных, так и в неопластических B-клетках. Злокачественные опухоли, полученные из B-клеток, такие как хронический лимфоцитарный лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз и многие неходжкинские лимфомы, часто сохраняют экспрессию CD19. Эта почти универсальная экспрессия и специфичность для одной клеточной линии сделали CD19 привлекательной мишенью для иммунотерапии. CD19 человека имеет 14 экзонов, причем экзоны 1-4 кодируют внеклеточную часть CD19, экзон 5 кодирует трансмембранную часть CD19, а экзоны 6-14 кодируют цитоплазматический хвост.

[0194] В одном варианте осуществления полезные нагрузки по настоящему изобретению могут представлять собой антитела, их фрагменты и варианты, которые специфичны к антигену CD19.

[0195] В некоторых вариантах осуществления иммунотерапевтический агент может представлять собой антитело, специфически иммунореактивное к антигену, выбранному из опухолеспецифического антигена (TSA), опухолеассоциированного антигена (TAA) или антигенного эпитопа.

[0196] В одном аспекте антиген может быть антигенным эпитопом. В некоторых вариантах осуществления антигенный эпитоп может быть CD19.

[0197] Опухольспецифический антиген (TSA) может быть опухолевым неоантигеном. Неоантиген представляет собой мутировавший антиген, который экспрессируется опухолевыми клетками только из-за генетических мутаций или изменений в транскрипции, которые изменяют кодирующие последовательности белка, создавая новые, чужеродные антигены. Генетические изменения возникают в результате генетической замены, вставки, делеции или любых других генетических изменений нативного когнатного белка (т.е. молекулы, которая экспрессируется в нормальных клетках).

Химерные антигенные рецепторы (CAR)

[0198] Биоциклы, описанные в настоящем документе, могут включать химерный антигенный рецептор. В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка по настоящему изобретению может представлять собой химерные антигенные рецепторы (CAR), которые при трансдукции в иммунные клетки (например, T-клетки и NK-клетки) могут перенаправлять иммунные клетки против мишени (например, опухолевой клетки), которая экспрессирует молекулу, распознаваемую внеклеточным нацеливающим фрагментом CAR.

[0199] Как используется в настоящем документе, термин «химерный антигенный рецептор (CAR)» относится к синтетическому рецептору, который имитирует ТКР на поверхности T-клеток. В целом, CAR состоит из внеклеточного нацеливающего домена, трансмембранного домена/области и внутриклеточного сигнального/активационного домена. В стандартном рецепторе CAR компоненты: внеклеточный нацеливающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный/активационный домен, линейно построены как единый слитый белок. Внеклеточная область включает нацеливающий домен/фрагмент (например, scFv), который распознает специфический опухолевый антиген или другие поверхностные молекулы опухолевых клеток. Внутриклеточная область может содержать сигнальный домен комплекса ТКР (например, сигнальную область CD3ζ), и/или один или более костимулирующих сигнальных доменов, таких как домены CD28, 4-1BB (CD137) и OX-40 (CD134). Например, «CAR первого поколения» имеет только сигнальный домен CD3ζ. В попытке увеличить персистенцию и пролиферацию T-клеток добавляют костимулирующие внутриклеточные домены, что приводит к появлению CAR второго поколения, имеющих сигнальный домен CD3ζ плюс один костимулирующий сигнальный домен, и CAR третьего

поколения, имеющих сигнальный домен CD3ζ плюс два или более костимулирующих сигнальных доменов. При экспрессии Т-клеткой CAR наделяет Т-клетку антигенной специфичностью, определяемой внеклеточным нацеливающем фрагментом CAR. В последнее время также желательно добавить один или более элементов, таких как гены хоуминга и суицидальные гены, чтобы разработать более компетентную и безопасную архитектуру CAR, так называемый CAR четвертого поколения.

[0200] В некоторых вариантах осуществления иммунотерапевтический агент эффекторного модуля представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR). Химерный антиген может включать внеклеточный нацеливающий фрагмент; трансмембранный домен; внутриклеточный сигнальный домен; и, необязательно, один или более костимулирующих доменов.

[0201] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный нацеливающий домен соединен через шарнир (также называемый пространственным доменом или спейсером) и трансмембранные области с внутриклеточным сигнальным доменом. Петля соединяет внеклеточный нацеливающий домен с трансмембранным доменом, который пересекает клеточную мембрану и соединяется с внутриклеточным сигнальным доменом. Для оптимизации действия CAR-экспрессирующих клеток на раковые клетки может потребоваться варьировать петлю в зависимости от размера целевого белка, с которым связывается нацеливающий фрагмент, а также от размера и аффинности самого нацеливающего домена. После распознавания и связывания нацеливающего фрагмента с клеткой-мишенью внутриклеточный сигнальный домен приводит к активации сигнала для CAR Т-клетки, который дополнительно усиливается «вторым сигналом» от одного или более внутриклеточных костимулирующих доменов. После активации CAR Т-клетки могут уничтожить клетку-мишень.

[0202] В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению может быть разделен на две части, с каждой из которых связан димеризующий домен, так что вход, запускающий димеризацию, способствует сборке интактного функционального рецептора. Wu и Lim недавно сообщили о расщепленном CAR, в котором внеклеточный CD19-связывающий домен и внутриклеточный сигнальный элемент разделены и связаны с доменом FKBP и доменом FRB* (мутант T2089L связывания рапамицина FKBP), которые гетеродимеризуются в присутствии аналога рапамицина AP21967. Расщепленный рецептор собирается в присутствии AP21967 и вместе со специфическим связыванием антигена активирует Т-клетки (Wu et al., Science, 2015, 625(6258): aab4077).

[0203] В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению может быть сконструирован как индуцибельный CAR. Sakemura et al. недавно сообщили о включении индуцибельной системы Tet-On в конструкцию CAR CD19. CAR CD19 активируется только в присутствии доксициклина (Докс). Sakemura сообщил, что Tet-CD19CAR Т-клетки в присутствии Докса были эквивалентно цитотоксичны против CD19+ клеточных линий и имели эквивалентную продукцию цитокинов и пролиферацию при стимуляции CD19, по сравнению с обычными CD19CAR Т-клетками (Sakemura et al., Cancer Immuno. Res., 2016, Jun 21, предварительная электронная публикация). В одном примере этот Tet-CAR может быть полезной нагрузкой эффекторного модуля под управлением SRE (например, ДД) по изобретению. Двойные системы обеспечивают большую гибкость при включении и выключении экспрессии CAR в трансдуцированных Т-клетках.

[0204] Согласно настоящему изобретению, полезная нагрузка по настоящему изобретению может быть CAR первого поколения, или CAR второго поколения, или CAR третьего поколения, или CAR четвертого поколения. В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка по настоящему изобретению может представлять собой полную конструкцию CAR, состоящую из внеклеточного домена, шарнира и трансмембранного домена и внутриклеточной сигнальной области. В других вариантах осуществления полезная нагрузка по настоящему изобретению может быть компонентом полной конструкции CAR, включая внеклеточный нацеливающий фрагмент, шарнирную область, трансмембранный домен, внутриклеточный сигнальный домен, один или более костимулирующих доменов и другие дополнительные элементы, улучшающие архитектуру и функциональность CAR, включая, помимо прочего, лидерную последовательность, элемент хоуминга и защитный переключающий элемент, или комбинацию таких компонентов.

[0205] CAR, регулируемые биоциклами и композициями по настоящему изобретению, являются настраиваемыми и, таким образом, обладают рядом преимуществ. Обратимый механизм включения-выключения позволяет справиться с острой токсичностью, вызванной чрезмерным размножением CAR-T клеток. Пульсирующая экспрессия CAR с использованием SRE по настоящему изобретению может быть достигнута путем циклического изменения уровня лиганда. Регулирование CAR с помощью лиганда может быть эффективным для компенсации ускользания опухоли, вызванного потерей антигена, предотвращения функционального истощения, вызванного тонической передачей сигнала вследствие хронического воздействия антигена, и улучшения персистенции CAR-экспрессирующих клеток in vivo.

[0206] В некоторых вариантах осуществления биоциклы и композиции по изобретению могут быть использованы для отрицательной регуляции экспрессии CAR для ограничения целевой токсичности в ткани, вызванной синдромом лизиса опухоли. Отрицательная регуляция экспрессии CAR по настоящему изобретению после достижения противоопухолевой эффективности может предотвратить (1) целевую внеопухолевую токсичность, вызванную экспрессией антигена в нормальной ткани, (2) независимую от антигена активацию in vivo.

Внеклеточный нацеливающий домен/фрагмент

[0207] В соответствии с изобретением, внеклеточный нацеливающий фрагмент CAR может быть любым агентом, который распознает и связывается с определенной целевой молекулой, например, неоантигеном на опухолевых клетках, с высокой специфичностью и аффинностью. Целевой фрагмент может представлять собой антитело и его варианты, которые специфически связываются с целевой молекулой на опухолевых клетках, или пептидный аптамер, выбранный из пула случайных последовательностей на основе его способности связываться с целевой молекулой на опухолевых клетках, или его вариант или фрагмент, который может связываться с целевой молекулой на опухолевых клетках, или антигенраспознающий домен нативного Т-клеточного рецептора (ТКР) (например, внеклеточный домен CD4 для распознавания ВИЧ-инфицированных клеток), или экзотические распознающие компоненты, такие как связанный цитокин, который приводит к распознаванию целевых клеток, несущих рецептор цитокина, или естественный лиганд рецептора.

[0208] В некоторых вариантах осуществления нацеливающий домен CAR может представлять собой NAR Ig, Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент, F(ab)'2-фрагмент, F(ab)'3-фрагмент, Fv, одноцепочечный вариабельный

фрагмент (scFv), бис-scFv, (scFv)2, минитело, диатело, триатело, тетратело, дисульфидно стабилизированный Fv-белок (dsFv), унитело, нанотело или антигенсвязывающую область, полученную из антитела, которое специфически распознает целевую молекулу, например, опухолеспецифический антиген (TSA). В одном варианте осуществления нацеливающий фрагмент представляет собой scFv. Домен scFv, когда он экспрессируется на поверхности CAR Т-клетки и впоследствии связывается с целевым белком на раковой клетке, способен удерживать CAR Т-клетку вблизи раковой клетки и запускать активацию Т-клетки. scFv может быть получен с помощью обычных методов технологии рекомбинантной ДНК и рассматривается в настоящем изобретении.

[0209] В одном аспекте внеклеточный нацеливающий фрагмент может представлять собой scFv, полученный из антитела. В одном аспекте scFv может специфически связываться с антигеном CD19.

Внутриклеточные сигнальные домены

[0210] Внутриклеточный домен слитого полипептида CAR после связывания с целевой молекулой передает сигнал эффекторной иммунной клетке, активируя по меньшей мере одну из нормальных эффекторных функций эффекторных иммунных клеток, включая цитолитическую активность (например, секрецию цитокинов) или хелперную активность. Таким образом, внутриклеточный домен включает в себя «внутриклеточный сигнальный домен» Т-клеточного рецептора (ТКР).

[0211] В некоторых аспектах может быть использован весь внутриклеточный сигнальный домен. В других аспектах может использоваться усеченная часть внутриклеточного сигнального домена вместо интактной цепи до тех пор, пока она передает сигнал эффекторной функции.

[0212] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен по настоящему изобретению может содержать сигнальные мотивы, которые известны как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы (ITAM). Примеры ITAM, содержащих цитоплазматические сигнальные последовательности, включают последовательности, полученные из ТКР CD 3дзета, FcR гамма, FcR бета, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В одном примере внутриклеточный сигнальный домен представляет собой сигнальный домен CD3 дзета (CD3ζ).

[0213] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточная область по настоящему изобретению дополнительно включает один или более костимулирующих сигнальных доменов, которые обеспечивают дополнительные сигналы эффекторным иммунным клеткам. Эти костимулирующие сигнальные домены в комбинации с сигнальным доменом могут дополнительно улучшить размножение, активацию, память, персистенцию и эффективность уничтожения опухолей иммунных клеток, сконструированными по технологии CAR (например, CAR Т-клеток). В некоторых случаях костимулирующая сигнальная область содержит 1, 2, 3 или 4 цитоплазматических домена одной или более внутриклеточных сигнальных и/или костимуляторных молекул. Костимулирующий сигнальный домен может быть внутриклеточным/цитоплазматическим доменом костимулирующей молекулы, включая CD2, CD7, CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD30, CD40, ICOS (CD278), GITR (рецептор фактора некроза опухоли, индуцированного глюкокортикоидами), LFA-1 (ассоциированный с функцией лимфоцитов антиген-1), LIGHT, NKG2C, B7-H3, но не ограничиваясь ими. В одном примере костимулирующий сигнальный домен получен из цитоплазматического домена CD28. В другом примере костимулирующий сигнальный домен получен из цитоплазматического домена 4-1BB (CD137). В другом примере костимулирующий сигнальный

домен может представлять собой внутриклеточный домен GITR, как описано в патенте США № 9175308; содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки во всей его полноте.

[0214] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточные сигнальные домены, описанные в международной патентной публикации WO 2014153270, могут быть применимы в настоящем изобретении.

[0215] В некоторых вариантах осуществления химерные антигенные рецепторы, описанные в данном документе, могут включать домены CD3 дзета, измененные для настройки активности CAR. Домены CD3 дзета могут включать одну или более мутаций в иммунорецепторных тирозиновых активирующих мотивах (ITAM). В одном аспекте, остатки тирозина в ITAM могут быть подвержены мутации, что приводит к снижению фосфорилирования и ограничению последующей передачи сигнала. В некоторых вариантах осуществления один или более ITAM могут быть удалены из домена CD3 дзета. В одном аспекте CD3 дзета может включать один ITAM. Любой из CAR и доменов CD3 дзета, описанных в Feucht et al. 2019, могут быть использованы в настоящем документе (Calibration of CAR activation potential directs alternative T cell fates and therapeutic potency. Nature Medicine 25, 82–88 (2019); содержание которого в полном объеме включено в настоящий документ посредством ссылки).

[0216] В некоторых вариантах осуществления костимулирующие домены GITR могут быть применимы в CAR, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления домены GITR могут быть способны индуцировать эффекторную функцию Т-клеток и активировать Т-клетки. В некоторых аспектах домены GITR, описанные в настоящем документе, могут быть способны подавлять ингибиторные Т-регуляторные клетки, которые блокируют иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления, содержащие внутриклеточный домен GITR CAR Т-клетки могут снижать выработку цитокинов, что может уменьшить синдром высвобождения цитокинов. Любой из доменов GITR описан в международной патентной публикации WO 2018045034; содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Трансмембранные домены и шарнирные области

[0217] В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению может включать трансмембранный домен. Как используется в настоящем документе, термин «трансмембранный домен (ТД)» в широком смысле относится к аминокислотной последовательности длиной около 15 остатков, которая охватывает плазматическую мембрану. Более предпочтительно, трансмембранный домен включает по меньшей мере 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 или 45 аминокислотных остатков и охватывает плазматическую мембрану. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен по настоящему изобретению может быть получен либо из природного, либо из синтетического источника. Трансмембранный домен CAR может быть получен из любого природного мембранносвязанного или трансмембранного белка. Например, трансмембранная область может быть получена из (т.е. содержать по меньшей мере трансмембранную область (области) альфа, бета или дзета цепи Т-клеточного рецептора, CD3 эпсилон, CD4, CD5, CD8, CD8α, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD152 или CD154.

[0218] Альтернативно, трансмембранный домен по настоящему изобретению может быть синтетическим. В некоторых аспектах синтетическая последовательность может включать преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин.

[0219] В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен по настоящему изобретению может быть выбран из группы, состоящей из трансмембранного домена CD8α, трансмембранного домена CD4, трансмембранного домена CD 28, трансмембранного домена CTLA-4, трансмембранного домена PD-1 и Fc-области IgG4 человека. В качестве неограничивающих примеров, трансмембранный домен может представлять собой трансмембранный домен CTLA-4, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1-5 по международной патентной публикации № WO 2014/100385; и трансмембранный домен PD-1, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6-8 по международной патентной публикации № WO 2014100385; содержание каждой из которых включено в настоящий документ путем ссылки во всей своей полноте.

[0220] В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению может включать необязательную шарнирную область (также называемую спейсером). Шарнирная последовательность - это короткая последовательность аминокислот, которая способствует гибкости внеклеточного нацеливающего домена, который перемещает мишеньсвязывающий домен от поверхности эффекторной клетки, чтобы обеспечить надлежащий контакт клетка/клетка, связывание мишени и активацию эффекторной клетки (Patel et al., Gene Therapy, 1999; 6: 412-419). Шарнирная последовательность может быть расположена между нацеливающим фрагментом и трансмембранным доменом.

[0221] В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению может содержать один или более линкеров между любыми доменами CAR. Длина линкера может составлять 1-30 аминокислот.

[0222] В некоторых вариантах осуществления компоненты, включая нацеливающий фрагмент, трансмембранный домен и внутриклеточные сигнальные домены по настоящему изобретению, могут быть сконструированы в одном слитом полипептиде. Слитый полипептид может быть полезной нагрузкой эффекторного модуля по изобретению. В некоторых вариантах осуществления в эффекторный модуль может быть включено более одного слитого полипептида CAR, например, два, три или более CAR могут быть включены в эффекторный модуль под контролем одного SRE (например, ДД).

[0223] В одном варианте осуществления конструкция CAR включает scFv CD19 (например, CAT13.1E10 или FMC63), спейсер CD8α или трансмембранный домен, а также эндодомен 4-1BB и CD3ζ. Эти конструкции с CAT13.1E10 могут иметь повышенную пролиферацию после стимуляции in vitro, повышенную цитотоксичность против CD19+ мишеней и повышенное взаимодействие эффекторов и мишеней по сравнению с конструкциями с FMC63.

[0224] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка по изобретению может представлять собой любую из костимулирующих молекул и/или внутриклеточных доменов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении может быть использована одна или более костимулирующих молекул, каждая из которых находится под контролем различных SRE. Костимулирующие молекулы, регулируемые SRE, также могут экспрессироваться в сочетании с CAR первого поколения, CAR второго поколения, CAR третьего поколения, CAR четвертого поколения или любой другой конструкцией CAR, описанной в настоящем документе.

Тандемный CAR (TanCAR)

[0225] В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению может представлять собой тандемный химерный антигенный рецептор (TanCAR), который способен нацеливаться на два, три,

четыре или более опухолеспецифических антигенов. В некоторых аспектах CAR представляет собой биспецифический TanCAR, включающий два нацеливающих домена, которые распознают два различных TSA на опухолевых клетках. Биспецифический CAR может быть дополнительно определен как содержащий внеклеточную область, включающую нацеливающий домен (например, домен распознавания антигена), специфичный для первого опухолевого антигена, и нацеливающий домен (например, домен распознавания антигена), специфичный для второго опухолевого антигена. В других аспектах CAR представляет собой мультиспецифический TanCAR, который включает три или более нацеливающих доменов, расположенных в тандемном расположении. Промежуток между нацеливающими доменами в TanCAR может составлять от около 5 до около 30 аминокислот в длину, например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30 аминокислот.

Расщепленный CAR

[0226] В некоторых вариантах осуществления компоненты, включая нацеливающий фрагмент, трансмембранный домен и внутриклеточные сигнальные домены по настоящему изобретению, могут быть разделены на две или более частей таким образом, что они зависят от нескольких входов, которые способствуют сборке интактного функционального рецептора. В одном варианте осуществления может быть сконструирована система расщепленного синтетического CAR, в которой сборка активированного рецептора CAR зависит от связывания лиганда с SRE (например, низкомолекулярным соединением) и антигена, специфического к нацеливающему фрагменту. В качестве неограничивающего примера, расщепленный CAR состоит из двух частей, которые собираются в зависимости от низкомолекулярного соединения; одна часть рецептора имеет внеклеточный антигенсвязывающий домен (например, scFv), а другая часть имеет внутриклеточные сигнальные домены, такие как внутриклеточный домен CD3ζ.

[0227] В других аспектах разделенные части системы CAR могут быть дополнительно модифицированы для увеличения сигнала. В одном примере вторая часть цитоплазматического фрагмента может быть прикреплена к плазматической мембране путем включения в конструкцию трансмембранного домена (например, трансмембранного домена CD8α). Ко второй части системы CAR может быть добавлен дополнительный внеклеточный домен, например, внеклеточный домен, опосредующий гомодимеризацию. Эти модификации могут повышать выходную активность рецептора, т.е. активировать Т-клетки.

[0228] В некоторых аспектах две части системы расщепленного CAR содержат гетеродимеризационные домены, которые условно взаимодействуют при связывании гетеродимеризующего низкомолекулярного вещества. Таким образом, компоненты рецептора собирают в присутствии низкомолекулярного вещества, образуя интактную систему, которая затем может быть активирована при взаимодействии с антигеном. Любые известные гетеродимеризующие компоненты могут быть включены в систему расщепленного CAR. Также могут быть использованы другие домены гетеродимеризации, зависящие от низкомолекулярного вещества, включая систему димеризации, индуцированную гиббереллином (GID1-GAI), димеризацию ecDHFR и FKBP, индуцированную триметоприм-SLF (Czlapinski et al., J Am Chem Soc., 2008, 130(40): 13186-13187) и димеризацию доменов PP2C и PYL, индуцированную ABA (абсцизовой кислотой) (Cutler et al., Annu Rev Plant Biol. 2010, 61: 651-679), но не ограничиваясь ими. Двойная регуляция с помощью индуцируемой сборки (например, лиганд-зависимая димеризация) и деградации (например, деградация CAR, индуцированная дестабилизирующим доменом) системы расщепленного CAR может обеспечить большую гибкость для контроля активности CAR-модифицированных Т-клеток.

Переключаемый CAR

[0229] В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению может быть сконструирован как переключаемый CAR. Juillerat et al (Juilerat et al., Sci. Rep., 2016, 6: 18950; содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки) недавно сообщили об управляемых CAR, которые могут быть транзиторно переключены в ответ на стимул (например, низкомолекулярное вещество). В этой конструкции CAR система интегрирована непосредственно в шарнирный домен, который отделяет домен scFv от домена клеточной мембраны в CAR. Такая система позволяет разделить или объединить различные ключевые функции CAR, такие как активация и костимуляция, в разных цепях рецепторного комплекса, имитируя сложность нативной архитектуры ТКР. Эта интегрированная система может переключать взаимодействие scFv и антигена между состояниями вкл/выкл, контролируемыми отсутствием/присутствием стимула.

Обратимый CAR

[0230] В других вариантах осуществления, CAR по изобретению может быть системой обратимого CAR. В этой архитектуре CAR в систему CAR включен домен LID (лиганд-индуцированной деградации). CAR может быть временно подавлен путем добавления лиганда домена LID. Комбинация LID и ДД-опосредованной регуляции обеспечивает настраиваемый контроль постоянно активированных CAR Т-клеток, тем самым снижая CAR-опосредованную токсичность тканей.

Активационно-обусловленный CAR

[0231] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка по изобретению может представлять собой активационно-обусловленный химерный антигенный рецептор, который экспрессируется только в активированной иммунной клетке. Экспрессия CAR может быть связана с областью условного контроля активации, которая относится к одной или более последовательностям нуклеиновых кислот, которые индуцируют транскрипцию и/или экспрессию последовательности, например, CAR под ее контролем. Такие области условного контроля активации могут быть промоторами генов, которые активируются во время активации эффекторной иммунной клетки, например, промотор IL2 или сайты связывания NFAT. В некоторых вариантах осуществления активация иммунной клетки может быть достигнута конститутивно экспрессированным CAR (международная публикация № WO 2016126608; содержание которой полностью включено в настоящий документ путем ссылки).

Полинуклеотиды

[0232] Компоненты биоцикла, включая эффекторные модули, их SRE и полезные нагрузки, могут быть на основе нуклеиновых кислот. Термин «нуклеиновая кислота» в самом широком смысле включает любое соединение и/или вещество, содержащее полимер нуклеотидов, например, связанных нуклеозидов. Эти полимеры часто называют полинуклеотидами. Иллюстративные нуклеиновые кислоты или полинуклеотиды согласно раскрытию включают, но не ограничиваются ими, рибонуклеиновые кислоты (РНК), дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК), треозо-нуклеиновые кислоты (ТНК), гликоль-нуклеиновые кислоты (ГНК), пептидо-нуклеиновые кислоты (ПНК), закрытые нуклеиновые кислоты (ЗНК, включая ЗНК, имеющую β-D-рибо-конфигурацию, α-ЗНК, имеющую α-L-рибо-конфигурацию (диастереомер ЗНК), 2'-амино-ЗНК, имеющую 2'-аминофункционализацию, и 2'-амино-α-ЗНК, имеющую 2'-аминофункционализацию), или их гибриды.

[0233] В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты представляет собой матричную РНК (мРНК). Как используется в настоящем документе, термин «матричная РНК» (мРНК) относится к любому полинуклеотиду, который кодирует представляющий интерес полипептид и который способен транслироваться для получения кодированного представляющего интерес полипептида in vitro, in vivo, in situ или ex vivo. Полинуклеотиды по изобретению могут представлять собой мРНК или любую молекулу нуклеиновой кислоты и могут быть или не быть химически модифицированными.

[0234] Обычно, основные компоненты молекулы мРНК включают по меньшей мере кодирующую область, 5′-UTR, 3′-UTR, 5′-кэп и поли-А хвост. Основываясь на этой модульной структуре дикого типа, настоящее изобретение расширяет функциональность традиционных молекул мРНК путем предоставления полезной нагрузки, которая сохраняет модульную организацию, но включает одну или более структурных и/или химических модификаций или изменений, которые придают полинуклеотиду полезные свойства, например, устойчивость функции. В контексте данного документа «структурная» особенность или модификация представляет собой признака или модификацию, при которой два или более связанных нуклеозида вставляются, удаляются, дублируются, инвертируются или рандомизируются в полинуклеотид без значительной химической модификации самих нуклеозидов. Поскольку химические связи обязательно будут разрушены и преобразованы для осуществления структурной модификации, структурные модификации имеют химическую природу и, следовательно, являются химическими модификациями. Однако структурные модификации приведут к образованию другой последовательности нуклеотидов. Например, полинуклеотид «ATCG» может быть химически модифицирован до «AT-5meC-G». Тот же полинуклеотид может быть структурно модифицирован с «ATCG» на «ATCCCG». В данном случае был вставлен динуклеотид «CC», что привело к структурной модификации полинуклеотида.

[0235] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды по настоящему изобретению могут содержать последовательности 5'UTR, которые играют роль в инициации трансляции. Последовательности 5'UTR могут включать такие элементы, как последовательности Kozak, которые, как известно, участвуют в процессе, посредством которого рибосома инициирует трансляцию генов. Последовательности Kozak имеют консенсусную последовательность XCCR(A/G) CCAUG, где R - пурин (аденин или гуанин) на три основания выше стартового кодона (AUG), а X - любой нуклеотид. В одном варианте осуществления последовательность Kozak представляет собой ACCGCC. Конструирование особенностей, которые обычно встречаются в обильно экспрессируемых генах целевых клеток или тканей, позволяет повысить стабильность и производство белка полинуклеотидов по изобретению.

[0236] Дополнительно предложены полинуклеотиды, которые могут содержать внутренний участок посадки рибосомы (IRES), играющий важную роль в инициации синтеза белка в отсутствие структуры 5' кэп в полинуклеотиде. IRES может выступать в качестве единственного сайта связывания рибосомы или может служить одним из нескольких сайтов связывания. Полинуклеотиды по изобретению, содержащие более одного функционального сайта связывания рибосомы, могут кодировать несколько пептидов или полипептидов, которые транслируются рибосомами независимо друг от друга, давая начало бицистронным и/или мультицистронным молекулам нуклеиновых кислот.

[0237] В одном варианте осуществления полинуклеотиды по настоящему изобретению могут кодировать вариантные полипептиды, которые имеют определенную идентичность с эталонной полипептидной

последовательностью. Как используется в настоящем документе, «эталонная полипептидная последовательность» относится к исходной полипептидной последовательности. Эталонные последовательности могут быть последовательностями дикого типа или любой последовательностью, на которую делается ссылка при конструировании другой последовательности.

[0238] Термин «идентичность», как известно в данной области, относится к взаимосвязи между двумя или более последовательностями, определяемой путем сравнения последовательностей. В данной области техники идентичность также означает степень родства последовательностей между последовательностями, определяемую количеством совпадений между цепочками из двух или более остатков (аминокислот или нуклеиновых кислот). Идентичность измеряет процент идентичных совпадений между двумя или более последовательностями с выравниванием гэпов (если таковые имеются), учитываемыми с помощью определенной математической модели или компьютерной программы (т.е. «алгоритмов»). Идентичность родственных последовательностей можно легко вычислить известными способами. Такие способы включают, помимо прочего, способы, описанные в Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991 и Carillo et al., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988).

[0239] В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта может иметь такую же или подобную активность, как и эталонная последовательность. Альтернативно, вариант может иметь измененную активность (например, повышенную или пониженную) по сравнению с эталонной последовательностью. Как правило, варианты конкретного полинуклеотида или полипептида по изобретению будут иметь по меньшей мере около 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, но менее 100% идентичности последовательности с конкретным эталонным полинуклеотидом или полипептидом, что определено с помощью программ выравнивания последовательности и параметров, описанных в настоящем документе и известных специалистам в данной области. Такие инструменты для выравнивания включают инструменты из набора BLAST (Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.)

Химические модификации полинуклеотидов

[0240] Согласно настоящему изобретению, термины «модификация» или, в соответствующих случаях, «модифицированные» полинуклеотиды означают модификацию в отношении нуклеотидов A, G, U (T в ДНК) или C.

[0241] Модификации полинуклеотидов по изобретению могут происходить по нуклеозидному основанию и/или сахарной части нуклеозидов, составляющих полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления в модифицированную нуклеиновую кислоту или в один или более отдельных нуклеозидов или нуклеотидов включены множество модификаций. Например, модификации нуклеозида могут включать одну или более модификаций азотистого основания и сахара. Модификации полинуклеотидов по настоящему изобретению могут включать любые из тех, которые описаны, например, в международной публикации WO

2013052523, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0242] Как описано в данном документе «нуклеозид» определяется как соединение, содержащее молекулу сахара (например, пентозу или рибозу) или ее производное в комбинации с органическим основанием (например, пурином или пиримидином) или его производным (также упоминается в данном документе как «нуклеотидное основание»). Как описано в данном документе, «нуклеотид» определяется как нуклеозид, содержащий фосфатную группу.

[0243] Модифицированные нуклеотиды, которые могут быть включены в полинуклеотид, могут быть модифицированы по межнуклеозидной связи (например, по фосфатному каркасу). В данном документе, в контексте полинуклеотидного каркаса, фразы «фосфат» и «фосфодиэфир» используются взаимозаменяемо. Группы фосфатных каркасов могут быть модифицированы путем замены одного или более атомов кислорода другим заместителем. Кроме того, модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды могут включать полную замену немодифицированного фосфатного фрагмента другой межнуклеозидной связью. Примеры модифицированных фосфатных групп включают, помимо прочего, фосфоротиоаты, фосфоноселенаты, боранофосфаты, эфиры боранофосфата, фосфонаты водорода, фосфорамидаты, фосфонодиамидиты, алкил- или арилфосфонаты и фосфотриэфиры. Оба несвязывающих атома кислорода замещены серой в фосфородитиоатах. Фосфатный линкер также может быть модифицирован путем замены связывающего кислорода на азот (соединенные мостиковой связью фосфорамидаты), серу (соединенные мостиковой связью фосфоротиоаты) или углерод (соединенные мостиковой связью метиленфосфонаты). Другие модификации, которые могут быть использованы, описаны, например, в международной заявке WO 2013052523, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0244] Различные модификации сахара, нуклеотидные модификации и/или межнуклеозидные связи (например, структуры каркасов) могут существовать в различных положениях полинуклеотида. Специалисту в данной области техники будет понятно, что аналоги нуклеотидов или другие модификации могут быть расположены в любом(-ых) положении(-ях) полинуклеотида, таким образом функция полинуклеотида существенно не снижается. Модификация также может быть 5′ или 3′ терминальной модификацией. Полинуклеотид может содержать от около 1% до около 100% модифицированных нуклеотидов (либо по отношению к общему содержанию нуклеотидов, либо по отношению к одному или более типам нуклеотидов, то есть любому одному или более из A, G, U или C) или любой промежуточный процент (например, от 1% до 20%, от 1% до 25%, от 1% до 50%, от 1% до 60%, от 1% до 70%, от 1% до 80%, от 1% до 90%, от 1% до 95%, от 10% до 20%, от 10% до 25%, от 10% до 50%, от 10% до 60%, от 10% до 70%, от 10% до 80%, от 10% до 90%, от 10% до 95%, от 10% до 100%, от 20% до 25%, от 20% до 50%, от 20% до 60%, от 20 % до 70%, от 20% до 80%, от 20% до 90%, от 20% до 95%, от 20% до 100%, от 50% до 60%, от 50% до 70%, от 50% до 80%, от 50% до 90%, от 50% до 95%, от 50% до 100%, от 70% до 80%, от 70% до 90%, от 70% до 95%, от 70% до 100%, от 80% до 90%, от 80% до 95%, от 80% до 100%, от 90% до 95%, от 90% до 100% и от 95% до 100%).

[0245] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает модифицированный пиримидин или пурин. В некоторых вариантах осуществления пиримидин или пурин в молекуле полинуклеотида может быть заменен от около 1% до около 100% модифицированного урацила или модифицированного уридина (например, от 1% до 20%, от 1% до 25%, от 1% до 50%, от 1% до 60%, от 1% до 70%, от 1% до 80%, от 1% до 90%, от 1% до 95%, от 10% до 20%, от 10% до 25%, от 10% до 50%, от 10% до 60%, от 10% до 70%, от 10%

до 80%, от 10% до 90%, от 10% до 95%, от 10% до 100%, от 20% до 25%, от 20% до 50%, от 20% до 60%, от 20% до 70%, от 20% до 80%, от 20% до 90%, от 20% до 95 %, от 20% до 100%, от 50% до 60%, от 50% до 70%, от 50% до 80%, от 50% до 90%, от 50% до 95%, от 50% до 100%, от 70% до 80%, от 70% до 90%, от 70% до 95%, от 70% до 100%, от 80% до 90%, от 80% до 95%, от 80% до 100%, от 90 до 95%, от 90 до 100% и от 95 до 100% модифицированного пиримидина или пурина.

[0246] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды могут включать две или более последовательностей компонентов эффекторного модуля, которые расположены по схеме, такой как ABABAB, AABBAABBAABB или ABCABCABC, или их варианты, повторяющиеся один, два или более трех раз. В этих схемах каждая буква, A, B или C, представляет собой отдельный компонент эффекторного модуля.

[0247] В еще одном варианте осуществления полинуклеотиды могут включать две или более последовательности компонентов эффекторного модуля, причем каждый компонент имеет одну или более последовательностей. В качестве неограничивающего примера, последовательности могут иметь такую схему, как ABABAB, AABBAABBAABB или ABCABCABC, или их варианты, повторяющиеся один, два или более трех раз в каждой из областей. В качестве другого неограничивающего примера, последовательности могут иметь такую схему, как ABABAB, AABBAABBAABB или ABCABCABC, или их варианты, повторяющиеся один, два или более трех раз по всему полинуклеотиду. В этих схемах каждая буква, A, B или C, представляет собой отдельную последовательность или компонент.

Отбор кодона

[0248] В некоторых вариантах осуществления один или более кодонов полинуклеотидов по настоящему изобретению могут быть заменены на другие кодоны, кодирующие нативную аминокислотную последовательность, чтобы настроить экспрессию SRE, в процессе, называемом отбором кодонов. Поскольку пулы кодонов мРНК и антикодонов тРНК обычно варьируются между организмами, типами клеток, субклеточным местоположением и с течением времени, описанный в данном документе отбор кодонов является пространственно-временным (ST, англ.: spatiotemporal) отбором кодонов.

[0249] В некоторых вариантах осуществления изобретения некоторые полинуклеотидные особенности могут быть оптимизированы по кодонам. Оптимизация кодонов относится к процессу модификации последовательности нуклеиновой кислоты для усиления экспрессии в клетке-хозяине путем замены по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50 или более кодонов нативной последовательности на кодоны, которые наиболее часто используются в генах данной клетки-хозяина, при сохранении нативной аминокислотной последовательности. Использование кодонов может быть измерено с помощью индекса адаптации кодонов (CAI, англ.: Codon Adaptation Index), который измеряет отклонение кодирующей полинуклеотидной последовательности от набора эталонных генов. Таблицы использования кодонов доступны в Codon Usage Database (http://www.kazusa.or.jp/codon/), а CAI можно рассчитать с помощью программы EMBOSS CAI (http://emboss.sourceforge.net/). Методы оптимизации кодонов известны в данной области и могут быть применимы в попытках достижения одной или более из нескольких целей. Эти цели включают в себя соответствие частот кодонов в организме-мишени и организме-хозяине для обеспечения правильной сборки, смещение содержания нуклеотидов для изменения стабильности или уменьшения вторичных структур, минимизацию кодонов с тандемными повторами или гомонуклеотидных трактов, которые могут нарушить конструкцию или экспрессию гена, настройку областей транскрипционного и трансляционного контроля, вставку или удаление сигнальных последовательностей белка,

удаление/добавление сайтов посттрансляционной модификации в кодируемом белке (например, сайтов гликозилирования), добавление, удаление или перетасовывание белковых доменов, вставку или удаление сайтов рестрикции, изменение сайтов связывания рибосом и сайтов деградации, регулирование скорости трансляции, чтобы позволить различным доменам белка собираться должным образом, или уменьшение или устранение проблемных вторичных структур в полинуклеотиде. В одном варианте осуществления полинуклеотидная последовательность или ее часть оптимизированы по кодонам с помощью алгоритмов оптимизации. Варианты кодонов для каждой аминокислоты хорошо известны в данной области, как и таблица различных видов для оптимизации экспрессии в данном конкретном виде.

[0250] В некоторых вариантах осуществления изобретения некоторые полинуклеотидные особенности могут быть оптимизированы по кодонам. Например, предпочтительная область для оптимизации кодона может находиться выше (5') или ниже (3') области, которая кодирует полипептид. Эти области могут быть включены в полинуклеотид до и/или после оптимизации кодонов области кодирования полезной нагрузки или открытой рамки считывания (ОРС).

[0251] После оптимизации (если необходимо) компоненты полинуклеотидов восстанавливают и трансформируют в вектор, такой как, помимо прочего, плазмиды, вирусы, космиды и искусственные хромосомы.

[0252] В некоторых вариантах осуществления определенные области полинуклеотида могут быть предпочтительными для отбора кодонов. Например, предпочтительная область для отбора кодона может находиться выше (5') или ниже (3') области, которая кодирует полипептид. Эти области могут быть включены в полинуклеотид до и/или после отбора кодонов области кодирования полезной нагрузки или открытой рамки считывания (ОРС).

[0253] Стоп-кодон полинуклеотидов по настоящему изобретению может быть модифицирован, чтобы включать последовательности и мотивы для изменения уровней экспрессии SRE, полезной нагрузки и эффекторных модулей по настоящему изобретению. Такие последовательности могут быть включены, чтобы вызвать считывание стоп-кодона, при этом стоп-кодон может указывать на аминокислоты, например селеноцистеин или пирролизин. В других случаях стоп-кодоны могут быть вообще пропущены, чтобы возобновить трансляцию через альтернативную открытую рамку считывания. Считывание стоп-кодона может быть использовано для настройки экспрессии компонентов эффекторных модулей в определенном соотношении (например, как подразумевается контекстом стоп-кодона). Примеры предпочтительных мотивов стоп-кодонов включают UGAN, UAAN и UAGN, где N представляет собой либо C, либо U.

[0254] Подавление терминации происходит во время трансляции многих вирусных мРНК как средство получения второго белка с удлиненным карбоксиконцом. В ретровирусах гены gag и pol кодируются одной мРНК и разделены янтарным терминирующим кодоном UAG. Супрессия трансляции янтарного кодона позволяет синтезировать предшественник gag pol. Супрессия трансляции опосредуется супрессорными тРНК, которые могут распознавать терминирующие кодоны и вставлять специфическую аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления эффекторные модули, описанные в настоящем документе, могут включать янтарные терминирующие кодоны. Такие кодоны могут быть использованы вместо или в дополнение к последовательностям IRES и p2A в бицистронных конструкциях. Считывание стоп-кодона может сочетаться с P2A для получения низкого уровня экспрессии следующего гена (например, IL12). В

некоторых вариантах осуществления янтарные стоп-кодоны могут быть объединены с экспрессией тРНК или аминоацил-тРНК-синтетазы для дальнейшего контроля. В одном аспекте полезная нагрузка может представлять собой регулируемую тРНК-синтетазу.

Конъюгаты

[0255] В соответствии с настоящим изобретением предполагается, что композиции по настоящему изобретению могут быть объедены в комплекс, конъюгированы или объединены с одной или более гомологичными или гетерологичными молекулами. Как используется в настоящем документе, термин «гомологичная молекула» относится к молекуле, которая сходна по меньшей мере по одному из параметров структуры или функции по сравнению с исходной молекулой, в то время как «гетерологичная молекула» - это молекула, которая отличается по меньшей мере по одному из параметров структуры или функции по сравнению с исходной молекулой. Таким образом, структурные гомологи - это молекулы, которые могут быть в значительной степени структурно схожи. В некоторых вариантах осуществления такие гомологи могут быть идентичными. Функциональные гомологи - это молекулы, которые могут быть в значительной степени функционально схожи. В некоторых вариантах осуществления такие гомологи могут быть идентичными.

[0256] Фармацевтические композиции, биоциклы, компоненты биоциклов, эффекторные модули, включая их SRE, или полезные нагрузки по настоящему изобретению могут содержать коньюгаты. Такие конъюгаты по изобретению могут включать встречающиеся в природе вещества или лиганды, такие как белки (например, сывороточный альбумин человека (HSA), липопротеин низкой плотности (LDL), липопротеин высокой плотности (HDL) или глобулин); углеводы (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин или гиалуроновая кислота); или липиды. Конъюгаты также могут быть рекомбинантными или синтетическими молекулами, такими как синтетические полимеры, например, синтетические полиаминокислоты, олигонуклеотид (например, аптамер). Примеры полиаминокислот могут включать полилизин (PLL), поли-L-аспарагиновую кислоту, поли-L-глутаминовую кислоту, сополимер стирола с ангидридом малеиновой кислоты, поли(L-лактид-со-гликолированный) сополимер, сополимер дивинилового эфира и малеинового ангидрида, N-(2-гидроксипропил) метакриламидный сополимер (HMPA), полиэтиленгликоль (ПЭГ), поливиниловый спирт (PVA), полиуретан, поли-(2-этилакриловую кислоту), полимеры N-изопропилакриламида или полифосфазина. Примеры полиаминов включают: полиэтиленимин, полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамин, псевдопептид-полиамин, пептидомиметический полиамин, дендримерный полиамин, аргинин, амидин, протамин, катионный липид, катионный порфирин, четвертичная соль полиамина или альфа-спиральный пептид.

[0257] В некоторых вариантах осуществления конъюгаты могут также включать нацеливающие группы. Как используется в настоящем документе, термин «нацеливающая группа» относится к функциональной группе или фрагменту, присоединенному к агенту, которые облегчает локализацию агента в желаемой области, ткани, клетке и/или белке. Такие нацеливающие группы могут включать, помимо прочего, агенты или группы, нацеленные на клетки или ткани (например, лектины, гликопротеины, липиды, белки, антитело, которое связывается с определенным типом клеток, например, клетками почек или другими типами клеток). В некоторых вариантах осуществления нацеливающие группы могут включать

[0258] , меланотропины, лектины, гликопротеины, поверхностно-активный белок А, углеводы муцина, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетил-галактозамин, N-ацетил-гулюкозамин, поливалентную маннозу, поливалентную фукозу, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентную

галактозу, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липиды, холестерин, стероиды, желчные кислоты, фолаты, витамин B12, биотин, пептид RGD, миметик пептида RGD или аптамер.

[0259] В некоторых вариантах осуществления нацеливающие группы могут представлять собой белки, например, гликопротеины, или пептиды, например, молекулы, обладающие специфическим сродством к CO-лиганду, или антитела, например, антитело, которое связывается с определенным типом клеток, таким как раковая клетка, эндотелиальная клетка или костная клетка. Нацеливающие группы могут также включать гормоны и/или гормональные рецепторы.

[0260] В некоторых вариантах осуществления нацеливающие группы могут быть любыми лигандами, способными нацеливаться на конкретные рецепторы. Примеры включают, помимо прочего, фолат, GalNAc, галактозу, маннозу, маннозу-6-фосфат, апатамеры, лиганды рецепторов интегринов, лиганды рецепторов хемокинов, трансферрин, биотин, лиганды рецепторов серотонина, PSMA, эндотелин, GCPII, соматостатин, лиганды ЛПНП и ЛПВП. В некоторых вариантах осуществления нацеливающие группы представляют собой аптамеры. Такие аптамеры могут быть немодифицированными или включать любую комбинацию модификаций, раскрытых в настоящем документе.

[0261] В других вариантах осуществления фармацевтические композиции, биоциклы, компоненты биоциклов, эффекторные модули, включая их SRE, или полезные нагрузки по настоящему изобретению могут быть ковалентно конъюгированы с проникающими в клетки полипептидами. В некоторых вариантах осуществления проникающие в клетки пептиды могут также включать сигнальные последовательности. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе конъюгаты могут иметь повышенную стабильность, повышенную трансфекцию клеток и/или измененное биораспределение (например, направленное на определенные ткани или типы клеток).

[0262] В некоторых вариантах осуществления конъюгирующие фрагменты могут быть добавлены к фармацевтическим композициям, биоциклам, компонентам биоциклов, эффекторным модулям, включая их SRE, или полезным нагрузкам по настоящему изобретению таким образом, что они позволяют прикреплять детектируемые метки к мишеням для очистки. Такие детектируемые метки включают, помимо прочего, биотиновые метки, убиквитины, флуоресцентные молекулы, гемагглютинин (ГА) гриппа человека, c-myc, гистидин (His), FLAG, глутатион-S-трансферазу (GST), V5 (парамиксовирус с эпитопом 5 вируса обезьян), биотин, авидин, стрептавидин, пероксидазу хрена (HRP) и дигоксигенин.

[0263] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, биоциклы, компоненты биоциклов, эффекторные модули, включая их SRE, или полезные нагрузки по настоящему изобретению могут быть объединены друг с другом или другими молекулами при лечении заболеваний и/или состояний.

Дополнительные свойства эффекторного модуля

[0264] Эффекторный модуль по настоящему изобретению может дополнительно содержать сигнальную последовательность, которая регулирует распределение представляющей интерес полезной нагрузки, иметь свойство расщепления и/или процессинга, которое облегчает отщепление полезной нагрузки от конструкции эффекторного модуля, сигнал нацеливания и/или проникновения, который может регулировать клеточную локализацию эффекторного модуля, метку и/или одну или более линкерных последовательностей, которые связывают различные компоненты эффекторного модуля.

[0265] В некоторых вариантах осуществления дополнительные свойства эффекторного модуля по настоящему изобретению включают, без ограничения, любые из тех, которые представлены в Таблице 7.

Таблица 7: Свойства эффекторного модуля

Признак	**Аминокисл. последовательность**	**Аминокисл. SEQ ID NO:**	**Нуклеот. последовательность или SEQ ID NO:**
EGFP	VSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYK	211128	211133
Метка FLAG	DYKDDDDK	211129	211134
Линкер (GSGSG)	GSGSG	211130	211135
HA-метка	YPYDVPDYA	211131	211136
Линкер (GS)	GS	-	ggatcc
Линкер (GSLDG)	GSLDG	211132	211137

Сигнальные последовательности

[0266] В дополнение к SRE и области полезной нагрузки, эффекторные модули по изобретению могут также включать один или более дополнительных особенностей, таких как одна или более сигнальных последовательностей.

[0267] Сигнальные последовательности (иногда называемые сигнальными пептидами, сигналами нацеливания, целевыми пептидами, последовательностями локализации, транзитными пептидами, лидерными последовательностями или лидерными пептидами) направляют белки (например, эффекторный модуль по настоящему изобретению) в их определенные клеточные и/или внеклеточные места. Белковые сигнальные последовательности играют центральную роль в нацеливании и транслокации почти всех секретируемых белков и многих интегральных мембранных белков.

[0268] Сигнальная последовательность - это короткий (длиной 5-30 аминокислот) пептид, присутствующий на N-конце большинства недавно синтезированных белков, предназначенных для

определенного места. Сигнальные последовательности могут распознаваться частицами узнавания сигналов (ЧУС) и расщепляться с помощью пептидаз сигнальных пептидов типов I и II. Сигнальные последовательности, полученные из белков человека, могут быть включены в качестве регуляторного модуля эффекторного модуля для направления эффекторного модуля в определенное клеточное и/или внеклеточное место. Эти сигнальные последовательности экспериментально проверены и могут быть расщеплены (Zhang Z. and Henzel W.J.; "Signal peptide prediction based on analysis of experimentally verified cleavage sites."; *Protein Sci*. 2004, 13:2819-2824).

[0269] В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность может быть, хотя и не обязательно, расположена на N-конце или C-конце эффекторного модуля, и может быть, хотя и не обязательно, отщеплена от желаемого эффекторного модуля для получения «зрелой» полезной нагрузки.

[0270] В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность, используемая в настоящем документе, может исключать метионин в положении 1 аминокислотной последовательности сигнальной последовательности. Это может называться мутацией M1del.

[0271] В дополнение к сигнальным последовательностям, возникающим естественным образом, например, из секретируемого белка, сигнальная последовательность может быть вариантом, модифицированным из известной сигнальной последовательности белка. Например, патенты США № 8258102 и 9133265, выданные Sleep, которые раскрывают модифицированную сигнальную последовательность альбумина, имеющую сигнал секреции и дополнительный X1-X2-X3-X4-X5-мотив, который может увеличить секрецию белка; патент США № 9279007, выданный Do, который раскрывает сигнальные последовательности модифицированных фрагментов связывающего белка тяжелой цепи иммуноглобулина человека (Bip), которые могут усиливать экспрессию и секрецию белка; патент США № 8148494, выданный Leonhartsberger et al., который раскрывает сигнальный пептид с сайтом расщепления, который может быть слит с рекомбинантным белком; содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[0272] В некоторых случаях секретируемые сигнальные последовательности могут быть цитокиновыми сигнальными последовательностями, такими как, помимо прочего, сигнальная последовательность IL2 или сигнальная последовательность p40.

[0273] В некоторых случаях могут использоваться сигнальные последовательности, направляющие представляющую интерес полезную нагрузку на поверхностную мембрану клетки-мишени. Экспрессия полезной нагрузки на поверхности клетки-мишени может быть пригодной для ограничения диффузии полезной нагрузки в нецелевые окружения *in vivo*, тем самым потенциально улучшая профиль безопасности полезных нагрузок. Кроме того, презентация на мембране полезной нагрузки может обеспечить физиологическую и качественную передачу сигнала, а также стабилизацию и рециркуляцию полезной нагрузки для более длительного периода полужизни. Мембранные последовательности могут представлять собой эндогенную сигнальную последовательность N-концевого компонента представляющей интерес полезной нагрузки. Как вариант, может быть желательно заменить эту последовательность на другую сигнальную последовательность. Сигнальные последовательности могут быть выбраны на основе их совместимости с секреторным путем представляющего интерес типа клеток таким образом, чтобы полезная нагрузка была представлена на поверхности Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления сигнальная

последовательность может быть сигнальной последовательностью IgE, сигнальной последовательностью CD8a (также называемой лидерной последовательностью CD8a), сигнальной последовательностью IL15Ra (также называемой лидерной последовательностью IL15Ra) или сигнальной последовательностью M1del CD8a (также называемой лидерной последовательностью M1del CD8).

[0274] Другие варианты сигнальных последовательностей, которые могут быть использованы в данном эффекторном модуле, могут включать те, которые обсуждаются в публикации патентной заявки США № 2007/0141666; публикации патентной заявки PCT № 1993/018181; содержание каждой из которых включено в настоящий документ путем ссылки во всей своей полноте.

[0275] Другие примеры сигнальных последовательностей включают вариант, который может представлять собой модифицированную сигнальную последовательность, рассмотренную в патентах США № 8148494; 8258102; 9133265; 9279007; и публикации патентной заявки США № 20070141666; и публикации международной патентной заявки № WO 1993018181; содержание каждого из которых включено в настоящий документ путем ссылки во всей своей полноте.

[0276] В других примерах сигнальная последовательность может быть гетерогенной сигнальной последовательностью из других организмов, таких как вирус, дрожжи и бактерии, которая может направлять эффекторный модуль в определенный клеточный сайт, например, в ядро (например, EP 1209450). Другие примеры могут включать сигнальные последовательности аспаргиновой протеазы (NSP24) из *Trichoderma*, которые могут увеличивать секрецию слитых белков, таких как ферменты (например, патент США № 8093016, выданный Cervin и Kim), сигнальные последовательности бактериальных липопротеинов (например, публикация заявки PCT № WO 199109952 на Lau и Rioux), сигнальные пептиды энтеротоксина II *E.coli* (например, патент США № 6605697, выданный Kwon et al.), сигнальную последовательность секреции *E.coli* (например, патентная публикация США № US 2016090404 на Malley et al.), сигнальную последовательность липазы из метилотрофных дрожжей (например, патент США № 8975041) и сигнальные пептиды ДНКаз, полученные из коринеформных бактерий (например, патент США № 4965197); содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0277] Сигнальные последовательности могут также включать сигналы ядерной локализации (СЯЛ) сигналы ядерного экспорта (СЯЭ), сигналы локализации тубуло-везикулярной структуры поляризованных клеток (см., например, патент США № 8993742; Cour et al., *Nucleic Acids Res.* 2003, 31(1): 393-396; содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте), сигналы внеклеточной локализации, сигналы субклеточной локализации (например, в лизосоме, эндоплазматическом ретикулуме, гольджи, митохондриях, плазматической мембране и пероксисомах и т.д.) (см., например, патент США № 7396811 и Negi et al., *Database,* 2015, 1-7; содержание каждого из которых включено в настоящий документ путем ссылки во всей своей полноте).

Сайты расщепления

[0278] В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль включает в себя функцию расщепления и/или процессинга.

[0279] Эффекторный модуль по настоящему изобретению может включать по меньшей мере один сигнал/сайт расщепления белка. Сигнал/сайт расщепления белка может быть расположен на N-конце, C-конце, на любом участке между N- и C-концами, например, помимо прочего, на половине пути между N- и C-

концами, между N-концом и точкой половины пути, между точкой половины пути и C-концом, а также их комбинаций.

[0280] Эффекторный модуль может включать один или более сигналов/сайтов расщепления любых протеиназ. Протеиназы могут быть сериновой протеиназой, цистеиновой протеиназой, эндопептидазой, дипептидазой, металлопротеиназой, глутаминовой протеиназой, треониновой протеиназой и аспаргиновой протеиназой. В некоторых аспектах сайт расщепления может представлять собой сигнальную последовательность фурина, актинидаина, кальпаина-1, карбоксипептидазы A, карбоксипептидазы P, карбоксипептидазы Y, каспазы-1, каспазы-2, каспазы-3, каспазы-4, каспазы-5, каспазы-6, каспазы-7, каспазы-8, каспазы-9, каспазы-10, катепсина B, катепсина C, катепсина G, катепсина H, катепсина K, катепсина L, катепсина S, катепсина V, клострипаина, химазы, химотрипсина, эластазы, эндопротеиназы, энтерокиназы, фактора Xa, муравьиной кислоты, гранзима B, матриксной металлопептидазы-2, матриксной металлопептидазы-3, пепсина, протеиназы K, SUMO-протеазы, субтилизина, TEV-протеазы, термолизина, тромбина, трипсина и TAGZyme.

Метки

[0281] В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль содержит белковую метку.

[0282] Белковая метка может быть использована для обнаружения и мониторинга обработки эффекторного модуля. Эффекторный модуль может включать одну или более меток, таких как метка эпитопа (например, метка FLAG или гемагглютинина (ГА)). Для представленных эффекторных модулей может быть использовано большое количество белковых меток. Они включают, помимо прочего, самовводящиеся полипептидные метки (например, галоалкандегалогеназа (halotag2 или halotag7), ACP-tag, clip-tag, MCP-tag, snap-tag), метки эпитопов (например, FLAG, ГА, His и Myc), флуоресцентные метки (например, зеленый флуоресцентный белок (GFP), красный флуоресцентный белок (RFP), желтый флуоресцентный белок (YFP) и их варианты), биолюминесцентные метки (например, люцифераза и ее варианты), аффинные метки (например, метка мальтозосвязывающего белка (MBP), метка глутатион-S-трансферазы (GST), иммуногенные аффинные метки (например, белок A/G, IRS, AU1, AU5, glu-glu, KT3, S-tag, HSV, VSV-G, Xpress и V5) и другие метки (например, биотин (низкомолекулярный), StrepTag (StrepII), SBP, белок-переносчик биотин-карбоксила (BCCP), eXact, CBP, CYD, HPC, CBD- интеин с хитин-связывающим доменом, Trx, NorpA и NusA.

[0283] В других вариантах осуществления метка также может быть выбрана из тех, которые описаны в патентах США № 8999897; 8357511; 7094568; 5011912; 4851341 и 4703004; публикациях патентных заявок США № US 2013115635 и US 2013012687; и международной публикации заявки № WO 2013091661; содержание каждого из которых включено в настоящий документ путем ссылки во всей своей полноте.

[0284] В некоторых аспектах может быть использовано множество белковых меток, одинаковых или разных; каждая из меток может быть расположена на одном и том же N- или C-конце, тогда как в других случаях эти метки могут быть расположены на каждом конце.

Линкеры

[0285] В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль содержит линкер.

[0286] В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль по изобретению может дополнительно содержать последовательность линкера. Линкерная область служит в основном в качестве спейсера между двумя или более полипептидами в составе эффекторного модуля. «Линкер» или «спейсер»,

как используется в данном документе, относится к молекуле или группе молекул, которые соединяют две молекулы или две части молекулы, например, два домена рекомбинантного белка.

[0287] В некоторых вариантах осуществления «линкер» (Л) или «линкерный домен» или «линкерная область» или «линкерный модуль» или «пептидный линкер», как используется в настоящем документе, относятся к олиго- или полипептидной области длиной от примерно 1 до 100 аминокислот, которая связывает вместе любой из доменов/областей эффекторного модуля (также называемого пептидным линкером). Пептидный линкер может иметь длину 1-40 аминокислот, или 2-30 аминокислот, или 20-80 аминокислот, или 50-100 аминокислот. Длина линкера также может быть оптимизирована в зависимости от типа используемой полезной нагрузки и на основе кристаллической структуры полезной нагрузки. В некоторых случаях предпочтительно выбирать линкер меньшей длины. В некоторых аспектах пептидный линкер состоит из аминокислот, соединенных между собой пептидными связями, предпочтительно от 1 до 20 аминокислот, соединенных пептидными связями, где аминокислоты выбраны из 20 встречающихся в природе аминокислот: глицин (G), аланин (A), валин (V), лейцин (L), изолейцин (I), серин (S), цистеин (C), треонин (T), метионин (M), пролин (P), фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W), гистидин (H), лизин (K), аргинин (R), аспартат (D), глутаминовая кислота (E), аспарагин (N) и глутамин (Q). Одна или более из этих аминокислот могут быть гликозилированы, что понятно специалистам в данной области.

[0288] Последовательность линкера может быть природным линкером, полученным из многодоменного белка. Природный линкер - это короткая пептидная последовательность, которая разделяет два различных домена или мотива в белке.

[0289] В некоторых аспектах линкеры могут быть гибкими или жесткими. В других аспектах линкеры могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми. В настоящем документе термины «расщепляемый линкерный домен или линкерная область» или «расщепляемый пептидный линкер» используются взаимозаменяемо. В некоторых вариантах осуществления последовательность линкера может быть расщеплена ферментативно и/или химически.

[0290] Линкеры по настоящему изобретению также могут быть непептидными линкерами. Например, могут быть использованы алкильные линкеры, такие как —NH—(CH_2) a-C(O)—, где a=2-20. Эти алкильные линкеры могут быть далее замещены любой не стерически затрудненной группой, такой как низший алкил (например, C_1-C_6), низший ацил, галоген (например, Cl, Br), CN, NH_2, фенил и т.д.

Нацеливающие или проникающие пептиды

[0291] В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль включает нацеливающий и/или проникающий пептид.

[0292] Низкомолекулярные нацеливающие и/или проникающие пептиды, которые избирательно распознают маркеры клеточной поверхности (например, рецепторы, трансмембранные белки и молекулы внеклеточного матрикса) могут быть использованы для нацеливания эффекторного модуля на нужные органы, ткани или клетки. Короткие пептиды (5-50 аминокислотных остатков), синтезированные *in vitro*, и пептиды природного происхождения, или их аналоги, варианты, производные, могут быть включены в эффекторный модуль для размещения эффекторного модуля в желаемых органах, тканях и клетках, и/или субклеточных местах внутри клеток.

[0293] В некоторых вариантах осуществления в эффекторный модуль может быть включена нацеливающая последовательность и/или проникающий пептид, чтобы направить эффекторный модуль в орган-мишень, или ткань, или клетку (например, раковую клетку). В других вариантах осуществления нацеливающий и/или проникающий пептид может направлять эффекторный модуль в конкретное субклеточное место внутри клетки. В качестве неограничивающих примеров, такие нацеливающие последовательности и/или проникающие пептиды могут включать последовательности для нацеливания эффекторного модуля на желаемую область центральной нервной системы (например, патент США № 9259432; публикация заявки США № 2015/259392); или жировой ткани (например, патенты США № 8067377 и 8710017); или простаты (например, патентная публикация США № 2016/0046668); содержание каждого из которых включено в настоящий документ путем ссылки во всей своей полноте.

[0294] В других вариантах осуществления нацеливающий и/или проникающий пептид может направлять эффекторный модуль в конкретное субклеточное место внутри клетки. В качестве неограничивающего примера, пептид, нацеленный на митохондрии, и/или пептид, проникающий через мембрану митохондрий, могут быть включены в эффекторный модуль, чтобы привести эффекторный модуль в действие в митохондриях клетки. См. например, патенты США № 9260495; 9173952 и 9132198; и публикацию заявки США № 2015/361140; содержание каждой из которых включено в настоящий документ путем ссылки во всей своей полноте.

[0295] Нацеливающий пептид имеет любое количество аминокислот от около 6 до около 30 включительно. Пептид может иметь 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислот. Как правило, нацеливающий пептид может иметь 25 или менее аминокислот, например, 20 или менее, например, 15 или менее.

[0296] Встречающийся в природе низкомолекулярные нацеливающие и/или проникающие пептиды, которые распознают конкретные ткани или клетки, связывают молекулы клеточной поверхности (например, рецепторы, трансмембранные белки) с высоким сродством, что делает их фрагментами, привлекательными для транспортировки. Такие пептиды могут включать пептидные токсины микроорганизмов, насекомых (например, скорпион, медоносная пчела, паук), животных (например, змеи) и растений, а также их аналоги, варианты и производные; и выделяемые пептидные гормоны, лиганды и сигнальные пептиды.

[0297] В некоторых аспектах аналоги, варианты и производные природных токсинов, которые отменяют их цитотоксическую активность, могут быть использованы в качестве пептидов-мишеней. Экзотоксин - это токсин, выделяемый бактериями. Было показано, что многие экзотоксины связывают специфические молекулы клеток. Например, энтеротоксины, группа белковых токсинов, вырабатываемых и выделяемых бактериальными организмами, связываются со слизистыми (эпителиальными) клетками стенки кишечника. Энтеротоксины могут включать, помимо прочего, термостабильный энтеротоксин (СТ) *E. coli*, холерный токсин (ХТ), термолабильный энтеротоксин (ЛТ) *E. coli*, токсин коклюша (ТК), полученный из *Bordetella pertussis*, экзотоксин А (ЭТА) *Pseudomonas aeruginosa*, энтеротоксины *Staphylococcus*, дифтерийный токсин, полученный из *Corynebacterium diphtheria*, энтеротоксин NSP4 из ротавируса. Другие экзотоксины включают нейротоксины, поражающие нервную систему, кардиотоксины, поражающие сердце, экзотоксины псевдомонад, нейротоксины ботулизма, токсин шига, шига-подобный токсин 1 и 2, токсины *Clostridium difficile*, токсин эпсилон *Clostridium perfringens* и токсин сибирской язвы.

[0298] В дополнение к экзотоксинам, другие токсины могут включать токсины, выделенные из растений, такие как RIP кукурузы, гелонин, противовирусный белок лаконоса, сапорин, триксантин, рицин, абрин; скорпионов, такие как харибдотоксин; паука, такие как PcTx1; улитки конус, такие как PcTx1; морского анемона, такие как гигантоксин-1; медоносных пчел, такие как меллитины, группа водорастворимых, катионных, амфипатических альфа-спиральных пептидов из 26 аминокислот, выделенных из яда медоносной пчелы *Apis mellifera* (западная или европейская или большая медоносная пчела), *Apis florea* (маленькая или карликовая медоносная пчела), *Apis dorsata* (гигантская медоносная пчела) и *Apis cerana* (восточная медоносная пчела); токсины змеиного яда, бомбезин, который первоначально был выделен из кожи жабы, который связывает рецепторы g-белковой пары рецепторов гастрин-высвобождающего пептида (например, BBR-1/2/3) в желудочно-кишечном тракте и головном мозге. См. например, Suchanek, G., et al., *PNAS* (1978) 75:701-704; содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[0299] Пептидные гормоны и другие сигнальные пептиды передают важные сообщения для связи между клетками, которые избирательно связывают клетки, экспрессирующие их рецепторы с высокой аффинностью. В некоторых аспектах пептидные гормоны могут быть включены в эффекторный модуль. Такие низкомолекулярные пептидные гормоны и сигнальные пептиды могут включать, помимо прочего, адипонектин, гормон, полученный из жировой ткани, сигнальный пептид агути, аллатостатин, амилин, ангиотензин, атриальный натрийуретический пептид, бомбезиноподобный пептид, большой гастрин, бетатрофин, брадикинин, кальцитонин, гормон, высвобождающий кортикотрофин, коситрофин, эндотелин, энтероглюкагон, FGF, FNDC5, фолликулостимулирующий гормон, гастрин, грелин, глюкагон и глюкагоноподобный пептид, гонадотрофин, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, гормон роста, гормон, высвобождающий гормон роста, гепсидин, хорионический гонадотрофин человека, человеческий плацентарный лактоген, инкретин, инсулин и аналоги инсулина, инсулиноподобный фактор роста, лептин, малый гастрина, лираглутид, лютеинизирующий гормон, меланокортин, минигастрин, альфа-меланоцит-стимулирующий гормон, нейропептид Y, фактор роста нервов (NGF), нейротрофин-3/4, инсулин НПХ, орексин, обестатин, остеокальцин, гормон поджелудочной железы, паратиреоидный гормон, пептидный гормон, пептид YY, пролактин, препрогормон, релакси, ренин, салкатонин, соматостатин (SST), секретин, субстанция P, синкалид, лептины костистых рыб, темпорин, тезаморелин, тиреоидный стимулирующий гормон, урокортин, вазоактивный пептид кишечника (ВПК), VGF и вителлогенин.

[0300] Нацеливающие и проникающие пептиды могут также представлять собой сконструированные биомиметические пептиды и/или химически модифицированные низкомолекулярные пептиды. Выявлены многочисленные пептиды со специфическими мотивами и последовательностями, которые нацелены на конкретные клетки и ткани с высокой аффинностью и селективностью в нормальных или патологических состояниях. Синтетический нацеливающий пептид может иметь длину до 30 аминокислот или быть длиннее. Нацеливающий пептид обычно имеет по меньшей мере около 5 аминокислот, но может иметь и меньше, например, 4 аминокислоты или 3 аминокислоты. Как правило, нацеливающий пептид имеет любое количество аминокислот от около 6 до около 30 включительно. Пептид может иметь 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислот. Как правило, нацеливающий пептид может иметь 25 или менее аминокислот, например, 20 или менее, например, 15 или менее.

[0301] Химерный пептид также может быть синтезирован с использованием слитых аминокислот из встречающихся в природе белков и искусственных аминокислотных последовательностей.

Стимулы

[0302] Биоциклы по настоящему изобретению запускаются одним или более стимулами. Стимулы включают лиганд, добавленный извне или эндогенный метаболит, присутствие или отсутствие определенного лиганда, присутствие или действие одного или более эффекторных модулей, градиент концентрации ионов или биомолекул и тому подобное.

Лиганды

[0303] В некоторых вариантах осуществления стимул представляет собой лиганд. Лиганды могут быть на основе нуклеиновых кислот, белков, липидов, органическими, неорганическими или любой комбинацией вышеперечисленного.

[0304] В некоторых вариантах осуществления лиганд может представлять собой, помимо прочего, белок, пептид, нуклеиновую кислоту, липид, производное липида, стерол, стероид, метаболит, производное метаболита и низкомолекулярное вещество.

[0305] В некоторых вариантах осуществления стимул представляет собой низкомолекулярное вещество. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярные вещества являются проницаемыми для клеток. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярные вещества одобрены FDA, безопасны и применяются перорально.

[0306] В некоторых вариантах осуществления лиганды связываются с карбоангидразами. В некоторых вариантах осуществления лиганд связывается с функцией карбоангидразы и ингибирует ее, и в настоящем документе называется ингибитором карбоангидразы.

[0307] В некоторых вариантах осуществления лиганд представляет собой низкомолекулярное вещество, которое связывается с карбоангидразой 2. В одном варианте осуществления низкомолекулярное вещество представляет собой ингибитор CA2. Примеры ингибиторов CA2 включают, помимо прочего, целекоксиб (также называемый целебрекс), вальдекоксиб, рофекоксиб, ацетазоламид, метазоламид, дорзоламид, бринзоламид, диклофенамид, этоксзоламид, зонисамид, дансиламид и дихлорфенамид.

[0308] В некоторых вариантах осуществления лиганды могут включать части низкомолекулярных веществ, известных для опосредованного связывания с CA2. Лиганды также могут быть модифицированы для уменьшения нецелевого связывания с карбоангидразами, отличными от CA2, и увеличения специфического связывания с CA2.

[0309] Лиганды также могут быть выбраны на основе анализа зависимости активности известного лиганда CA2 от его молекулярной/химической структуры, путем изучения зависимости активности от структуры (ЗАС). Для идентификации стабилизирующих лигандов по изобретению может быть использован любой из методов, связанных с ЗАС, известных в данной области. ЗАС может быть использован для улучшения таких свойств лиганда, как специфичность, активность, фармакокинетика, биодоступность и безопасность. ЗАС-анализ известных ингибиторов CA2 может также сочетаться с рентгеновскими структурами высокого разрешения CA2 в комплексе с лигандами.

[0310] В одном варианте осуществления стимулы по настоящему изобретению могут представлять собой одобренные FDA лиганды, способные связываться с конкретными ДД или целевыми областями в ДД.

[0311] В некоторых вариантах осуществления предпочтительно выбирать лиганды, которые не влияют на активность иммунной клетки и/или химерного антигенного рецептора в отсутствие SRE.

[0312] В некоторых вариантах осуществления для стабилизации одного и того же элемента ответа на стимул могут использоваться два или более лигандов.

Конъюгаты лигандов

[0313] В некоторых вариантах осуществления лиганд может быть связан с другой молекулой, такой как, помимо прочего, другой лиганд, белок, пептид, нуклеиновая кислота, липид, производное липида, стерол, стероид, метаболит, производное метаболита или низкомолекулярное вещество. В некоторых вариантах осуществления стимул-лиганд входит в комплекс или связывается с одной или более другими молекулами. В некоторых вариантах осуществления стимул-лиганд находится в комплексе или связан с одним или более различными видами и/или количеством других молекул. В некоторых вариантах осуществления стимул-лиганд представляет собой мультимер лиганда того же типа. В некоторых вариантах осуществления мультимерный стимул-лиганд включает 2, 3, 4, 5, 6 или более мономеров.

[0314] Лиганды, такие как низкомолекулярные вещества, которые, как известно, связывают потенциальные белки, могут быть протестированы на предмет их регуляции в белковых ответах. Низкомолекулярные вещества могут быть клинически одобрены как безопасные и имеющие соответствующую фармацевтическую кинетику и распределение. В некоторых вариантах осуществления стимул представляет собой лиганд дестабилизирующего домена (ДД), например, низкомолекулярное вещество, которое связывает дестабилизирующий домен и стабилизирует POI, слитую с дестабилизирующим доменом.

[0315] В некоторых вариантах осуществления стимул представляет собой низкомолекулярное вещество. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярные вещества являются проницаемыми для клеток.

Встроенные стимулы, сигналы или другие регуляторные фрагменты

[0316] В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль по настоящему изобретению может дополнительно включать одну или более микроРНК, сайты связывания микроРНК, промоторы и настраиваемые элементы.

микроРНК

[0317] В одном из вариантов осуществления микроРНК может быть использована для создания настраиваемых биоциклов. Каждый аспект или настроенная модальность может привносить в эффекторный модуль или биоцикл дифференциально настроенный признак. Например, дестабилизирующий домен может изменить сайты расщепления, свойства димеризации или период полужизни полезной нагрузки, а включение одной или более микроРНК или сайта связывания микроРНК может обеспечить ненацеливание на клетки или особенности транспорта. Следовательно, настоящее изобретение охватывает биоциклы, которые являются многофакторными по своей устойчивости. Такие биоциклы и эффекторные модули могут быть сконструированы таким образом, чтобы содержать одну, две, три, четыре или более настроенных особенностей.

[0318] МикроРНК (или миРНК) - это некодирующие РНК длиной 19-25 нуклеотидов, которые связываются с 3′UTR молекул нуклеиновой кислоты и снижают экспрессию генов либо путем снижения стабильности молекул нуклеиновой кислоты, либо путем ингибирования трансляции. Полинуклеотиды по изобретению могут включать одну или более последовательностей-мишеней микроРНК, последовательностей микроРНК или затравочной области микроРНК.

[0319] Например, если полинуклеотид не предназначен для доставки в печень, но оказывается там, то miR-122, микроРНК, которой много в печени, может ингибировать экспрессию полинуклеотида, если в полинуклеотид встроен один или более целевых сайтов miR-122. Введение одного или более сайтов связывания для различных микроРНК может быть сконструировано для дальнейшего снижения долговечности, стабильности и трансляции белка из полинуклеотида, что обеспечивает дополнительный уровень устойчивости, помимо отбора стимулов, конструирования SRE и вариаций полезной нагрузки.

[0320] Как используется в данном документе, термин «сайт микроРНК» относится к сайту-мишени микроРНК или сайту распознавания микроРНК, или любой нуклеотидной последовательности, с которой связывается или ассоциируется микроРНК. Следует понимать, что «связывание» может следовать традиционным правилам гибридизации Уотсона-Крика или может отражать любую стабильную ассоциацию микроРНК с целевой последовательностью в или рядом с сайтом микроРНК.

[0321] И наоборот, для целей полинуклеотидов по настоящему изобретению, сайты связывания микроРНК могут быть сконструированы из (т.е. удалены из) последовательностей, в которых они встречаются в природе, чтобы увеличить экспрессию белка в определенных тканях. Например, сайты связывания miR-122 могут быть удалены для улучшения экспрессии белка в печени.

[0322] Регуляция экспрессии в различных тканях может быть осуществлена путем введения или удаления одного или более сайтов связывания микроРНК.

[0323] В частности, известно, что микроРНК дифференциально экспрессируются в иммунных клетках (также называемых гемопоэтическими клетками), таких как антигенпрезентирующие клетки (АПК) (например дендритные клетки и макрофаги), макрофаги, моноциты, В-лимфоциты, Т-лимфоциты, гранулоциты, природные клетки-киллеры и т. д. микроРНК, специфические микроРНК клеток, участвуют в иммуногенности, аутоиммунности, иммунном - ответе на инфекцию, воспалении, а также в нежелательном иммунном ответе после генной терапии и трансплантации тканей/органов. Специфические для иммунных клеток микроРНК также регулируют многие аспекты развития, пролиферации, дифференцировки и апоптоза гемопоэтических клеток (иммунных клеток). Например, miR-142 и miR-146 экспрессируются исключительно в иммунных клетках, особенно в больших количества в миелоидных дендритных клетках. Введение сайта связывания miR-142 в 3'-UTR полипептида по настоящему изобретению может избирательно подавлять экспрессию гена в антигенпрезентирующих клетках через miR-142-опосредованную деградацию мРНК, ограничивая презентацию антигена в профессиональных АПК (например, дендритных клетках) и тем самым предотвращая антиген-опосредованный иммунный ответ после доставки генов (см, Annoni A et al., blood, 2009, 114, 5152-5161, содержание которого включено в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

[0324] В одном варианте осуществления сайты связывания микроРНК, которые, как известно, экспрессируются в иммунных клетках, в частности, в антигенпрезентирующих клетках, могут быть встроены в полинуклеотиды для подавления экспрессии полинуклеотида в АПК посредством микроРНК-опосредованной деградации РНК, подавляя антиген-опосредованный иммунный ответ, в то время как экспрессия полинуклеотида поддерживается в неиммунных клетках, где специфические для иммунных клеток микроРНК не экспрессируются.

[0325] Было проведено множество исследований экспрессии микроРНК, описанных в данной области, для определения дифференциальной экспрессии микроРНК в различных раковых клетках/тканях и при других заболеваниях. Некоторые микроРНК аномально сверхэкспрессируются в определенных раковых клетках, а другие недостаточно экспрессируются. Например, микроРНК дифференциально экспрессируются в раковых клетках (WO2008/154098, US2013/0059015, US2013/0042333, WO2011/157294); раковых стволовых клетках (US2012/0053224); злокачественных новообразованиях и заболеваниях поджелудочной железы (US2009/0131348, US2011/0171646, US2010/0286232, US8389210); астме и воспалении (US8415096); раке простаты (US2013/0053264); гепатоцеллюлярной карциноме (WO2012/151212, US2012/0329672, WO2008/054828, US8252538); клетки рака легкого (WO2011/076143, WO2013/033640, WO2009/070653, US2010/0323357); Т-клеточной лимфоме кожи (WO2013/011378); клетки колоректального рака (WO2011/0281756, WO2011/076142); лимфатических узлах положительных по раку (WO2009/100430, US2009/0263803); раке носоглотки (EP2112235); хронической обструктивной болезни легких (US2012/0264626, US2013/0053263); раке щитовидной железы (WO2013/066678); клетках рака яичников (US2012/0309645, WO2011/095623); клетках рака молочной железы (WO2008/154098, WO2007/081740, US2012/0214699), лейкозе и лимфоме (WO2008/073915, US2009/0092974, US2012/0316081, US2012/0283310, WO2010/018563), содержание каждой из которых включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

[0326] В одном из вариантов осуществления микроРНК может быть использована, как описано в настоящем документе, для создания настраиваемых биоциклов.

[0327] В некоторых вариантах осуществления эффекторные модули могут быть сконструированы таким образом, чтобы кодировать (в виде ДНК, РНК или иРНК) одну или более полезных нагрузок, SRE и/или регуляторную последовательность, такую как микроРНК или сайт связывания микроРНК. В некоторых вариантах осуществления любая из кодированных полезных нагрузок или SRE может быть стабилизирована или дестабилизирована путем мутации, а затем объединена с одной или более регуляторными последовательностями для создания двойного или мульти-настроенного эффекторного модуля или системы биоцикла.

[0328] Каждый аспект или настроенная модальность может привносить в эффекторный модуль или биоцикл дифференциально настроенный признак. Например, SRE может представлять собой дестабилизирующий домен, в то время как мутации в полезной нагрузке белка могут изменить его сайты расщепления, свойства димеризации или период полужизни, а включение одной или более микроРНК или сайта связывания микроРНК может обеспечить нацеливание на клетки или особенности транспорта. Следовательно, настоящее изобретение охватывает биоциклы, которые являются многофакторными по своей устойчивости.

[0329] Такие биоциклы могут быть сконструированы таким образом, чтобы содержать одну, две, три, четыре или более настроенных особенностей.

Промоторы

[0330] В некоторых вариантах осуществления композиции по изобретению содержат промотор.

[0331] В данном документе промотор определяется как последовательность ДНК, распознаваемая транскрипционным механизмом клетки, необходимая для инициации специфической транскрипции

полинуклеотидной последовательности по настоящему изобретению. Векторы могут включать нативные или ненативные промоторы, функционально связанные с полинуклеотидами по изобретению. Выбранные промоторы могут быть сильными, слабыми, конститутивными, индуцибельными, тканеспецифичными, специфичными для конкретной стадии развития и/или специфичными для конкретного организма. Одним из примеров приемлемого промотора является немедленно ранний промотор цитомегаловируса (ЦМВ), такой как SEQ ID NO: 210476-210478, но не ограничиваясь им. Эта промоторная последовательность является сильной конститутивной промоторной последовательностью, способной стимулировать высокий уровень экспрессии полинуклеотидной последовательности, функционально связанной с ней. Другим примером промотора является фактор элонгации 1-альфа (EF-1 альфа), такой как SEQ ID NO: 210479-210483, но не ограничиваясь им. Также могут быть использованы другие конститутивные промоторы, включая, помимо прочего, вируса обезьян 40 (SV40), вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), промотор длинных концевых повторов (ДКП), промотор вируса лейкоза птиц, немедленно ранний промотор вируса Эпштейна-Барр, промотор вируса саркомы Рауса, а также промоторы генов человека, включая, помимо прочего, промотор фосфоглицераткиназы (ФГК) (неограничивающие примеры включают SEQ ID NO: 210484-210491), промотор актина, промотор миозина, промотор гемоглобина, промотор убиквитина C (Ubc), промотор малого ядерного белка U6 человека и промотор креатинкиназы. В некоторых случаях могут использоваться индуцибельные промоторы, такие как промотор металлотионеина, промотор глюкокортикоидов, промотор прогестерона и промотор тетрациклина, но не ограничиваясь ими.

[0332] В некоторых вариантах осуществления оптимальный промотор может быть выбран на основе его способности достигать минимальной экспрессии SRE и полезных нагрузок по изобретению в отсутствие лиганда и детектируемой экспрессии в присутствии лиганда.

[0333] Дополнительные элементы промотора, например энхансеры могут использоваться для регулирования частоты инициации транскрипции. Такие области могут быть расположены на 10-100 пар оснований выше или ниже от сайта начала трансляции. В некоторых случаях два или более промоторных элемента могут использоваться для кооперативной или независимой активации транскрипции.

[0334] В некоторых вариантах осуществления промотор по изобретению может быть промотором Tet-ON. Комбинация Tet-системы для регуляции транскрипции с ДД позволяет одновременно контролировать экспрессию генов и стабильность белков. Любая из двойных Tet ON-ДД систем, описанных в Pedone et al. (2018) doi: https://doi.org/10.1101/404699, может быть применима в настоящем изобретении (содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте).

Другие регуляторные особенности

[0335] В некоторых вариантах осуществления композиции по изобретению могут содержать необязательные адаптеры протеасом. Как используется в настоящем документе, термин «адаптер протеасомы» относится к любой последовательности нуклеотидов/аминокислот, которая нацелена на добавленную полезную нагрузку для деградации. В некоторых аспектах адаптеры нацеливают полезную нагрузку для деградации непосредственно, что позволяет обойти необходимость в реакциях убиквитинирования. Адаптеры протеасом могут использоваться в комбинации с дестабилизирующими доменами для снижения исходной экспрессии полезной нагрузки. Примерные адаптеры протеасом включают UbL-домен Rad23 или hHR23b, HPV E7, который связывается как с целевым белком Rb, так и с S4-

субъединицей протеасомы с высокой аффинностью, что позволяет напрямую нацеливать протеасому, минуя механизм убиквитинирования; белок ганкирин, который связывается с Rb и S6-субъединицей протеасомы.

Примерные конструкции эффекторных модулей

[0336] Биоциклы по настоящему изобретению могут включать по меньшей мере один эффекторный модуль, который может включать по меньшей мере один SRE, полученный из CA2 (именуемый «SRE CA2»), который может быть функционально связан по меньшей мере с одной представляющей интерес полезной нагрузкой. Эти типы биоциклов и эффекторных модулей называются «биоциклами CA2» и «эффекторными модулями CA2». Кроме того, эффекторный модуль CA2 может включать дополнительные особенности, включая, помимо прочего, сигнальные последовательности, линкер, спейсеры, метки, FLAG, сайты расщепления и IRES. Любой из примерных SRE (например, ДД), представляющих интерес полезных нагрузок, сигнальных последовательностей, линкеров, спейсеров, меток, FLAG, сайтов расщепления и IRES, описанных в настоящем документе или известных в данной области, может быть объединен для создания эффекторных модулей CA2 по настоящему изобретению.

Представляющие интерес полезные нагрузки

[0337] В одном варианте осуществления эффекторный модуль CA2 включает в себя представляющую интерес полезную нагрузку. Представляющая интерес полезная нагрузка может быть полипептидом дикого типа, фрагментом полипептида дикого типа и/или включать одну или более мутаций относительно полипептида дикого типа.

[0338] В одном варианте осуществления эффекторный модуль CA2 производит регулируемый интерлейкин-15 (IL15).

[0339] В одном варианте осуществления эффекторный модуль CA2 продуцирует регулируемую субъединицу альфа рецептора интерлейкина-15 (IL15Ra).

[0340] В одном варианте осуществления эффекторный модуль CA2 продуцирует регулируемый флуоресцентный белок. В одном варианте осуществления по меньшей мере одна полезная нагрузка в эффекторном модуле CA2 представляет собой белок mCherry. В одном варианте осуществления по меньшей мере одна полезная нагрузка в эффекторном модуле CA2 представляет собой последовательность Renilla luciferase дикого типа (SEQ ID NO: 210643, кодируемую SEQ ID NO: 210644). В одном варианте осуществления по меньшей мере одна полезная нагрузка в эффекторном модуле CA2 представляет собой последовательность люциферазы Renilla. В одном варианте осуществления по меньшей мере одна полезная нагрузка в эффекторном модуле CA2 представляет собой последовательность люциферазы светлячка. В одном варианте осуществления по меньшей мере одна полезная нагрузка в эффекторном модуле CA2 представляет собой область последовательности люциферазы светлячка. В одном варианте осуществления по меньшей мере одна полезная нагрузка в эффекторном модуле CA2 представляет собой последовательность GFP Aequorea coerulescens (AcGFP). В одном варианте осуществления по меньшей мере одна полезная нагрузка в эффекторном модуле CA2 представляет собой область последовательности AcGFP.

[0341] В одном варианте эффекторном эффекторный модуль CA2 производит регулируемый scFV CD19. Эффекторный модуль CA2 может включать полезную нагрузку трансмембранного домена и/или цитоплазматического домена из другого родительского белка, а также полезную нагрузку scFV CD19. В

одном варианте осуществления по меньшей мере одна полезная нагрузка в эффекторном модуле CA2 включает по меньшей мере одну мутацию по сравнению с последовательностью дикого типа.

[0342] В одном варианте осуществления эффекторный модуль CA2 производит регулируемый CAR.

[0343] В некоторых аспектах полезные нагрузки, описанные в настоящем документе, могут быть совместно экспрессированы с химерным антигенным рецептором.

[0344] В одном варианте осуществления эффекторный модуль CA2 производит регулируемый интерлейкин-12 (IL12).

[0345] В одном варианте осуществления эффекторный модуль производит регулируемый

[0346] .

[0347] Биоциклы CA2 и/или эффекторные модули CA2 по настоящему изобретению могут быть моноцистронными или мультицистронными, что означает создание одной (моноцистронной) или более одной (мультицистронной) единицы (например, представляющей интерес полезной нагрузки). Если образуются две единицы, биоцикл CA2 или эффекторный модуль CA2 считается бицистронным.

[0348] В одном варианте осуществления по меньшей мере один эффекторный модуль CA2 по настоящему изобретению является моноцистронным.

[0349] В одном варианте осуществления по меньшей мере один эффекторный модуль CA2 по настоящему изобретению является мультицистронным.

[0350] В одном варианте осуществления по меньшей мере один эффекторный модуль CA2 по настоящему изобретению является бицистронным.

[0351] В одном варианте осуществления биоцикл CA2 по настоящему изобретению является моноцистронным.

[0352] В одном варианте осуществления биоцикл CA2 по настоящему изобретению является мультицистронным.

[0353] В одном варианте осуществления биоцикл CA2 по настоящему изобретению является бицистронным.

Эффекторные модули CA2 GFP

[0354] В одном варианте осуществления ДД CA2 слиты с AcGFP через линкерную последовательность на N-конце или C-конце слитой конструкции. Они называются «эффекторными модулями CA2 GFP». Дестабилизирующие и лиганд-зависимые стабилизирующие свойства слитых белков могут быть оценены с помощью таких методов, как вестерн-блоттинг и FACS. Примеры мутантов CA2, слитых с GFP, приведены в Таблице 8. Конструкции можно клонировать в любой вектор, известный в данной области, такой как, помимо прочего, векторы pLVX.IRES. Puro. В таблице 8 астерикс обозначает трансляцию стоп-кодона.

Таблица 8: Конструкции CA2 GFP

Описание	**Последовательность**	**Аминокисл. SEQ ID NO:**	**Нуклеот. SEQ ID NO:**
	GSG	-	

Линкер (GSG) (BamH1-Gly)			GGATCCGGT
Линкер (GS) (BamH1)	GS	-	GGATCC
Линкер (SLDG)	SLDG	210667	210668; 210669
Сайт расщепления P2A	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	208337	208338
OT-001986 (AcGFP (1-239 ДТ); линкер (GSG) (BamH1-Gly); CA2 (ак 2-260 ДТ); стоп)	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNYKSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKEDGNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYKGSGSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK*	210670	210671
OT-001987 (AcGFP (1-239 ДТ); линкер (GS) (BamH1); CA2 (ак 2-260 ДТ); линкер (SLDG); сайт расщепления P2A; mCherry (M1L); стоп)	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNYKSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKEDGNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYKGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFKSLDGATNFSLLKQAGDVEENPGPLSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEG	210672	210673

	RPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAY VKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQ DSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPVMQKKTMGWEAS SERMYPEDGALKGEIKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYK AKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGR HSTGGMDELYK*		
OT-001515 (AcGFP (1-239 ДТ); линкер (GS) (BamH1); CA2 (ак 2-260 ДТ, W208S); линкер (SLDG); сайт расщепления P2A; mCherry (M1L); стоп)	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKFSVSGEGEGDA TYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYP DHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNYKSRAEV KFEGDTLVNRIELTGTDFKEDGNILGNKMEYNYNAHN VYIMTDKAKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNT PIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMIYFGFV TAAAITHGMDELYKGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRIL NNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHW GSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKA VQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTSI VLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPA QPLKNRQIKASFKSLDGATNFSLLKQAGDVEENPGPLS KGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEG RPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAY VKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQ DSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPVMQKKTMGWEAS SERMYPEDGALKGEIKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYK AKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGR HSTGGMDELYK*	210674	210675
OT-001976 (AcGFP (1-239 ДТ); линкер (GS) (BamH1); CA2 (ак 2-260 ДТ, Y51N); линкер (SLDG); сайт расщепления P2A; mCherry (M1L); стоп)	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKFSVSGEGEGDA TYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYP DHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNYKSRAEV KFEGDTLVNRIELTGTDFKEDGNILGNKMEYNYNAHN VYIMTDKAKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNT PIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMIYFGFV TAAAITHGMDELYKGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSNDQATSLRIL NNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHW GSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKA VQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTW	210676	210677

	IVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRP AQPLKNRQIKASFKSLDGATNFSLLKQAGDVEENPGPL SKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEG RPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAY VKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQ DSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPVMQKKTMGWEAS SERMYPEDGALKGEIKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYK AKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGR HSTGGMDELYK*		
OT-001977 (AcGFP (1-239 ДТ); линкер (GS) (BamH1); CA2 (ак 2-260 ДТ, S56N); линкер (SLDG); сайт расщепления P2A; mCherry (M1L); стоп)	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKFSVSGEGEGDA TYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYP DHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNYKSRAEV KFEGDTLVNRIELTGTDFKEDGNILGNKMEYNYNAHN VYIMTDKAKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNT PIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMIYFGFV TAAAITHGMDELYKGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATNLRIL NNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHW GSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKA VQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTW IVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRP AQPLKNRQIKASFKSLDGATNFSLLKQAGDVEENPGPL SKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEG RPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAY VKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQ DSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPVMQKKTMGWEAS SERMYPEDGALKGEIKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYK AKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGR HSTGGMDELYK*	210678	210679
OT-001978 (AcGFP (1-239 ДТ); линкер (GS) (BamH1); CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, V241F, P249L); линкер (SLDG); сайт	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKFSVSGEGEGDA TYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYP DHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNYKSRAEV KFEGDTLVNRIELTGTDFKEDGNILGNKMEYNYNAHN VYIMTDKAKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNT PIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMIYFGFV TAAAITHGMDELYKGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRIL NNGHAFNVEFDFSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHW	210680	210681

расщепления P2A; mCherry (M1L); стоп)	GSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKA VQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTW IVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMFDNWRP AQLLKNRQIKASFKSLDGATNFSLLKQAGDVEENPGPL SKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEG RPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAY VKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQ DSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPVMQKKTMGWEAS SERMYPEDGALKGEIKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYK AKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGR HSTGGMDELYK*		
OT-001979 (AcGFP (1-239 ДТ); линкер (GS) (BamH1); CA2 (ак 2-260 ДТ, D71L, T87N, L250R); линкер (SLDG); сайт расщепления P2A; mCherry (M1L); стоп)	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKFSVSGEGEGDA TYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYP DHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNYKSRAEV KFEGDTLVNRIELTGTDFKEDGNILGNKMEYNYNAHN VYIMTDKAKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNT PIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMIYFGFV TAAAITHGMDELYKGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRIL NNGHAFNVEFLDSQDKAVLKGGPLDGNYRLIQFHFHW GSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKA VQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTW IVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRP AQPRKNRQIKASFKSLDGATNFSLLKQAGDVEENPGPL SKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEG RPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAY VKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQ DSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPVMQKKTMGWEAS SERMYPEDGALKGEIKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYK AKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGR HSTGGMDELYK*	210682	210683
OT-001980 (AcGFP (1-239 ДТ); CA2 (ак 2-260 ДТ, L183S); сайт расщепления	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKFSVSGEGEGDA TYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYP DHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNYKSRAEV KFEGDTLVNRIELTGTDFKEDGNILGNKMEYNYNAHN VYIMTDKAKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNT PIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMIYFGFV	210684	210685

P2A; mCherry (M1L); стоп)	TAAAITHGMDELYKGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFP IAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRIL NNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHW GSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKA VQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGSLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWI VLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPA QPLKNRQIKASFKSLDGATNFSLLKQAGDVEENPGPLS KGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEG RPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAY VKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQ DSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPVMQKKTMGWEAS SERMYPEDGALKGEIKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYK AKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGR HSTGGMDELYK*		
OT-001681 (AcGFP (1-239 ДТ); линкер (GSG) (BamH1-Gly); CA2 (ак 2-260 ДТ, E106D, C205S); линкер (SLDG); сайт расщепления P2A; mCherry (M1L); стоп)	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKFSVSGEGEGDA TYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYP DHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNYKSRAEV KFEGDTLVNRIELTGTDFKEDGNILGNKMEYNYNAHN VYIMTDKAKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNT PIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMIYFGFV TAAAITHGMDELYKGSGSHHWGYGKHNGPEHWHKD FPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFH WGSLDGQGSDHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFG KAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKT KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLESV TWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNW RPAQPLKNRQIKASFKSLDGATNFSLLKQAGDVEENPG PLSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEG EGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSK AYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTV TQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPVMQKKTMGWE ASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLKDGGHYDAEVKTTY KAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEG RHSTGGMDELYK*	210686	210687
OT-001682 (AcGFP (1-239 ДТ); линкер	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKFSVSGEGEGDA TYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYP DHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNYKSRAEV	210688	210689

(GSG) (BamH1-Gly); CA2 (ак 2-260 ДТ, C205S, W208S); линкер (SLDG); сайт расщепления P2A; mCherry (M1L); стоп)	KFEGDTLVNRIELTGTDFKEDGNILGNKMEYNYNAHN VYIMTDKAKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNT PIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMIYFGFV TAAAITHGMDELYKGSGSHHWGYGKHNGPEHWHKD FPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFH WGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFG KAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKT KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLESV TSIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNW RPAQPLKNRQIKASFKSLDGATNFSLLKQAGDVEENPG PLSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEG EGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSK AYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTV TQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPVMQKKTMGWE ASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLKDGGHYDAEVKTTY KAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEG RHSTGGMDELYK*		
OT-001570 (AcGFP (1-239 ДТ); линкер (GSG) (BamH1-Gly); CA2 (ак 2-260 ДТ, C205S); сайт расщепления P2A; mCherry (M1L); стоп)	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKFSVSGEGEGDA TYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYP DHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNYKSRAEV KFEGDTLVNRIELTGTDFKEDGNILGNKMEYNYNAHN VYIMTDKAKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNT PIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMIYFGFV TAAAITHGMDELYKGSGSHHWGYGKHNGPEHWHKD FPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFH WGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFG KAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKT KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLESV TWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNW RPAQPLKNRQIKASFKSLDGATNFSLLKQAGDVEENPG PLSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEG EGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSK AYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTV TQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPVMQKKTMGWE ASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLKDGGHYDAEVKTTY KAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEG RHSTGGMDELYK*	210690	210691

OT-002006 (AcGFP (1-239 ДТ); линкер (GSG); CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, E69V, N231I); стоп)	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKFSVSGEGEGDA TYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYP DHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNYKSRAEV KFEGDTLVNRIELTGTDFKEDGNILGNKMEYNYNAHN VYIMTDKAKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNT PIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMIYFGFV TAAAITHGMDELYKGSGSHHWGYGKHNGPEHWHKD FPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNDHAFNVVFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHF HWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDF GKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIK TKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLEC VTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFIGEGEPEELMVDN WRPAQPLKNRQIKASFK*	210853	210854
OT-002001 (AcGFP (1-239 ДТ); линкер (GSG); CA2 (ак 2-260 ДТ, F20L, K45N, G104R, A116V); стоп)	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKFSVSGEGEGDA TYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYP DHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNYKSRAEV KFEGDTLVNRIELTGTDFKEDGNILGNKMEYNYNAHN VYIMTDKAKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNT PIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMIYFGFV TAAAITHGMDELYKGSGSHHWGYGKHNGPEHWHKD LPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLNPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFH WGSLDGQRSEHTVDKKKYAVELHLVHWNTKYGDFG KAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKT KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECV TWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNW RPAQPLKNRQIKASFK*	210855	210856

[0355] Дополнительные примеры мутантов CA2, слитых с GFP, приведены в Таблице 9. Конструкции можно клонировать в любой вектор, известный в данной области, такой как, помимо прочего, векторы pLVX.IRES. Puro.

Таблица 9: Конструкции CA2 GFP

Название конструкции	**ID конструкции**	**Описание**	**Аминокисл. последовательность**	**Аминокисл. SEQ**	**Нуклеот. SEQ ID NO:**

				ID NO:	
OT-CA2-006	OT-002823	AcGFP (Met start) - линкер (GSG) - CA2 (M1del, E106D) - IRES - Puro	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNYKSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKEDGNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYKGSGSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSDHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK**SR*YDSLEIPPLSLPPP*RYWPKPLGIRPVCVCLYVIFHHIAVFWQCEGPETWPCLLDEHS*GSFPSRQRNARSVECREGSSSSGSFLKTNNVCSDPLQAAEPPTWRQVPLRPKATCIRYTCKGGTTPVPRCELDSCGKSQMALLKRIQQGAEGCPEGTPLYGI*SGASVHMLYMCLVEVKKTSRPPEPRGRGFPLKNTMISLPQPTRRRPSMTEYKPTVRLATRDDVPRAVRTLAAAFADYPATRHTVDPDRHIERVTELQELFLTRVGLDIGKVWVADDGAAVAVWTTPESVEAGAVFAEIGPRMAELSGSRLAAQQQMEGLLAPHRPKEPAWFLATVGVSPDHQGKGLGSAVVLPGVEAAERAGVPAFLETSAPRNLPFYERLGFTVTADVEVPEGPRTWCMTRKPGA*	211040; 211138; 211139; 211140; 211141	211076

OT-CA2-029	OT-001994	AcGFP - линкер (GSG) - CA2 (M1del, I59N, G102R)	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHK FSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKL PVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMK QHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKED GNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAK NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN TPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPN EKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYK GSGSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIA KGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVS YDQATSLRNLNNGHAFNVEFDDSQDK AVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDR QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKY GDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAK PGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDP RGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVT WIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEG EPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK*	211041	211077
OT-CA2-031	OT-002005	AcGFP - линкер (GSG) - CA2 (M1del, L197P)	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHK FSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKL PVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMK QHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKED GNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAK NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN TPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPN EKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYK GSGSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIA KGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVS YDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDK AVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDG QGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKY GDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAK PGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDP RGLLPESLDYWTYPGSPTTPPLLECVT WIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEG EPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK*	211042	211078

OT-CA2-032	OT-002004	AcGFP - линкер (GSG) - CA2 (M1del, L156H, S172C, F178Y, E186D)	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNYKSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKEDGNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYKGSGSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGHQKVVDVLDSIKTKGKCADFTNYDPRGLLPDSLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK*	211043	211079
OT-CA2-033	OT-002003	AcGFP - линкер (GSG) - CA2 (M1del, L156H)	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNYKSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKEDGNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYKGSGSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGHQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK*	211044	211080

OT-CA2-034	OT-002002	AcGFP - линкер (GSG) - CA2 (M1del, R27L, T87I, H122Y, N252D)	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHK FSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKL PVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMK QHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKED GNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAK NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN TPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPN EKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYK GSGSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIA KGELQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVS YDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDK AVLKGGPLDGIYRLIQFHFHWGSLDGQ GSEHTVDKKKYAAELHLVYWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKP GLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPR GLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTW IVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEP EELMVDNWRPAQPLKDRQIKASFK*	211045	211081
OT-CA2-038	OT-002187	AcGFP - линкер (GS) - CA2 (I59N) - линкер (SLDG) - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHK FSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKL PVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMK QHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKED GNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAK NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN TPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPN EKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYK GSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAK GERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSY DQATSLRNLNNGHAFNVEFDDSQDKA VLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQ GSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKP GLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPR GLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTW IVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEP EELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFKSL DGATNFSLLKQAGDVEENPGPLSKGEE DNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEI	211046	211082

			EGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPF AWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVT QDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPV MQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGE IKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKP VQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQ YERAEGRHSTGGMDELYK*		
OT- CA2-039	OT- 00218 8	AcGFP - линкер (GS) - CA2 (G63D) - линкер (SLDG) - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHK FSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKL PVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMK QHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKED GNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAK NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN TPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPN EKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYK GSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAK GERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSY DQATSLRILNNDHAFNVEFDDSQDKA VLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQ GSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKP GLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPR GLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTW IVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEP EELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFKSL DGATNFSLLKQAGDVEENPGPLSKGEE DNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEI EGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPF AWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVT QDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPV MQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGE IKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKP VQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQ YERAEGRHSTGGMDELYK*	21104 7	211083

OT-CA2-046	OT-002490	AcGFP - линкер (GS) - CA2 (M1del, H122Y) - линкер (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNYKSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKEDGNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYKGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVYWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFKSLDGATNFSLLKQAGDVEENPGPLSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYK*	211048	211084
OT-CA2-058	OT-002828	AcGFP - линкер (GS) - CA2 (M1del, G63D, M240L) - линкер (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNYKSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKEDGNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYKGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSY	211049	211085

			DQATSLRILNNDHAFNVEFDDSQDKA VLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQ GSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKP GLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPR GLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTW IVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEP EELLVDNWRPAQPLKNRQIKASFKSLD GATNFSLLKQAGDVEENPGPLSKGEED NMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIE GEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPF AWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVT QDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPV MQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGE IKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKP VQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQ YERAEGRHSTGGMDELYK*		
OT-CA2-059	OT-002829	AcGFP - линкер (GS) - CA2 (M1del, A77I, P249F) - линкер (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHK FSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKL PVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMK QHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKED GNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAK NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN TPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPN EKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYK GSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAK GERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSY DQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKIV LKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQG SEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGD FGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPG LQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRG LLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWI VLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPE ELMVDNWRPAQFLKNRQIKASFKSLD GATNFSLLKQAGDVEENPGPLSKGEED NMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIE GEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPF	211050	211086

			AWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVT QDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPV MQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGE IKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKP VQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQ YERAEGRHSTGGMDELYK*		
OT-CA2-060	OT-002830	AcGFP - CA2 (M1del, D71K, T192F) - линкер (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHK FSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKL PVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMK QHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKED GNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAK NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN TPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPN EKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYK GSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAK GERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSY DQATSLRILNNGHAFNVEFKDSQDKA VLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQ GSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKP GLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPR GLLPESLDYWFYPGSLTTPPLLECVTW IVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEP EELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFKSL DGATNFSLLKQAGDVEENPGPLSKGEE DNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEI EGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPF AWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVT QDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPV MQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGE IKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKP VQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQ YERAEGRHSTGGMDELYK*	211051	211087
OT-CA2-070	OT-002347	Метка HA - линкер (GS) - CA2 (M1del, L156H) - линкер	MYPYDVPDYAGSSHHWGYGKHNGPE HWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKY DPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFN	211052	211088

		(GSGSG) - метка FLAG - EGFP - линкер (GS) - линкер (GSLDG) - P2A - mCherry	VEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQF HFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAEL HLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVL GIFLKVGSAKPGHQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSL TTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKF RKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLK NRQIKASFKGSGSGDYKDDDDKVSKG EELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSG EGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWP TLVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFF KSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRA EVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILG HKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVN FKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDG PVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKRDH MVLLEFVTAAGITLGMDELYKGSGSL DGATNFSLLKQAGDVEENPGPLSKGEE DNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEI EGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPF AWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVT QDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPV MQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGE IKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKP VQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQ YERAEGRHSTGGMDELYK*		
OT-CA2-073	OT-002832	AcGFP - линкер (GS) - CA2 (M1del, R27L, H122Y) - линкер (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHK FSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKL PVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMK QHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKED GNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAK NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN TPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPN EKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYK GSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAK GELQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSY DQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKA VLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQ	211053	211089

			GSEHTVDKKKYAAELHLVYWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKP GLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPR GLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTW IVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEP EELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFKSL DGATNFSLLKQAGDVEENPGPLSKGEE DNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEI EGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPF AWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVT QDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPV MQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGE IKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKP VQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQ YERAEGRHSTGGMDELYK*		
OT-CA2-075	OT-002834	AcGFP - линкер (GS) - CA2 (M1del, T87I, H122Y) - линкер (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHK FSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKL PVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMK QHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKED GNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAK NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN TPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPN EKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYK GSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAK GERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSY DQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKA VLKGGPLDGIYRLIQFHFHWGSLDGQG SEHTVDKKKYAAELHLVYWNTKYGD FGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPG LQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRG LLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWI VLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPE ELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFKSLD GATNFSLLKQAGDVEENPGPLSKGEED NMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIE GEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPF AWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVT	211054	211090

			QDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPV MQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGE IKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKP VQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQ YERAEGRHSTGGMDELYK*		
OT-CA2-077	OT-002836	AcGFP - линкер (GS) - CA2 (M1del, H122Y, N252D) - линкер (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHK FSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKL PVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMK QHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKED GNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAK NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN TPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPN EKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYK GSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAK GERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSY DQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKA VLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQ GSEHTVDKKKYAAELHLVYWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKP GLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPR GLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTW IVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEP EELMVDNWRPAQPLKDRQIKASFKSL DGATNFSLLKQAGDVEENPGPLSKGEE DNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEI EGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPF AWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVT QDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPV MQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGE IKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKP VQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQ YERAEGRHSTGGMDELYK*	211055	211091
OT-CA2-078	OT-002939	AcGFP - линкер (GS) - CA2 (M1del, D72F, V241F) - линкер (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHK FSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKL PVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMK QHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKED	211056	211092

			GNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAK NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN TPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPN EKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYK GSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAK GERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSY DQATSLRILNNGHAFNVEFDFSQDKAV LKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQG SEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGD FGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPG LQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRG LLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWI VLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPE ELMFDNWRPAQPLKNRQIKASFKSLD GATNFSLLKQAGDVEENPGPLSKGEED NMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIE GEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPF AWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVT QDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPV MQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGE IKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKP VQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQ YERAEGRHSTGGMDELYK*		
OT-CA2-079	OT-002837	AcGFP - линкер (GS) - CA2 (M1del, V241F, P249L) - линкер (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHK FSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKL PVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMK QHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKED GNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAK NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN TPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPN EKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYK GSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAK GERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSY DQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKA VLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQ GSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKP GLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPR	211057	211093

			GLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTW IVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEP EELMFDNWRPAQLLKNRQIKASFKSL DGATNFSLLKQAGDVEENPGPLSKGEE DNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEI EGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPF AWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVT QDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPV MQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGE IKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKP VQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQ YERAEGRHSTGGMDELYK*		
OT-CA2-080	OT-002838	AcGFP - линкер (GS) - CA2 (M1del, D72F, P249L) - линкер (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHK FSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKL PVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMK QHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKED GNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAK NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN TPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPN EKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYK GSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAK GERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSY DQATSLRILNNGHAFNVEFDFSQDKAV LKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQG SEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGD FGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPG LQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRG LLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWI VLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPE ELMVDNWRPAQLLKNRQIKASFKSLD GATNFSLLKQAGDVEENPGPLSKGEED NMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIE GEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPF AWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVT QDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPV MQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGE IKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKP	211058	211094

			VQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQ YERAEGRHSTGGMDELYK*		
OT-CA2-081	OT-002839	AcGFP - линкер (GS) - CA2 (M1del, D71L, T87N) - линкер (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHK FSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKL PVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMK QHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKED GNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAK NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN TPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPN EKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYK GSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAK GERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSY DQATSLRILNNGHAFNVEFLDSQDKA VLKGGPLDGNYRLIQFHFHWGSLDGQ GSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKP GLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPR GLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTW IVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEP EELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFKSL DGATNFSLLKQAGDVEENPGPLSKGEE DNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEI EGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPF AWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVT QDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPV MQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGE IKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKP VQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQ YERAEGRHSTGGMDELYK*	211059	211095
OT-CA2-082	OT-002840	AcGFP - линкер (GS) - CA2 (M1del, D71L, L250R) - линкер (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHK FSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKL PVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMK QHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKED GNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAK NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN TPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPN	211060	211096

			EKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYK GSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAK GERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSY DQATSLRILNNGHAFNVEFLDSQDKA VLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQ GSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKP GLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPR GLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTW IVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEP EELMVDNWRPAQPRKNRQIKASFKSL DGATNFSLLKQAGDVEENPGPLSKGEE DNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEI EGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPF AWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVT QDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPV MQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGE IKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKP VQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQ YERAEGRHSTGGMDELYK*		
OT-CA2-085	OT-002349	AcGFP - линкер (GS) - CA2 (Y51T) - линкер (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHK FSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKL PVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMK QHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKED GNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAK NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN TPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPN EKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYK GSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAK GERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVST DQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKA VLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQ GSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKP GLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPR GLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTW IVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEP EELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFKSL	211061	211097

			DGATNFSLLKQAGDVEENPGPLSKGEE DNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEI EGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPF AWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVT QDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPV MQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGE IKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKP VQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQ YERAEGRHSTGGMDELYK*		
OT-CA2-086	OT-002350	AcGFP - линкер (GS) - CA2 (S73N, R89F) - линкер (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHK FSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKL PVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMK QHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKED GNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAK NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN TPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPN EKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYK GSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAK GERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSY DQATSLRILNNGHAFNVEFDDNQDKA VLKGGPLDGTYFLIQFHFHWGSLDGQ GSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKP GLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPR GLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTW IVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEP EELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFKSL DGATNFSLLKQAGDVEENPGPLSKGEE DNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEI EGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPF AWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVT QDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPV MQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGE IKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKP VQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQ YERAEGRHSTGGMDELYK*	211062	211098

OT-CA2-087	OT-002543	AcGFP - линкер (GS) - CA2 (D72F, P249F) - линкер (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNYKSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKEDGNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYKGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDFSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQFLKNRQIKASFKSLDGATNFSLLKQAGDVEENPGPLSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYK*	211063	211099
OT-CA2-088	OT-002544	AcGFP - линкер (GS) - CA2 (T55K, G63N, Q248N) - линкер (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNYKSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKEDGNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYKGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSY	211064	211100

			DQAKSLRILNNNHAFNVEFDDSQDKA VLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQ GSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKP GLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPR GLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTW IVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEP EELMVDNWRPANPLKNRQIKASFKSL DGATNFSLLKQAGDVEENPGPLSKGEE DNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEI EGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPF AWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVT QDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPV MQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGE IKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKP VQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQ YERAEGRHSTGGMDELYK*		
OT-CA2-089	OT-002545	AcGFP - линкер (GS) - CA2 (Y193I) - линкер (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHK FSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKL PVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMK QHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKED GNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAK NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN TPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPN EKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYK GSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAK GERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSY DQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKA VLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQ GSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKP GLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPR GLLPESLDYWTIPGSLTTPPLLECVTWI VLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPE ELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFKSLD GATNFSLLKQAGDVEENPGPLSKGEED NMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIE GEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPF	211065	211101

			AWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVT QDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPV MQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGE IKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKP VQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQ YERAEGRHSTGGMDELYK*		
OT-CA2-090	OT-002351	AcGFP - линкер (GS) - CA2 (S56F) - линкер (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHK FSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKL PVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMK QHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKED GNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAK NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN TPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPN EKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYK GSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAK GERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSY DQATFLRILNNGHAFNVEFDDSQDKA VLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQ GSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKP GLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPR GLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTW IVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEP EELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFKSL DGATNFSLLKQAGDVEENPGPLSKGEE DNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEI EGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPF AWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVT QDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPV MQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGE IKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKP VQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQ YERAEGRHSTGGMDELYK*	211066	211102
OT-CA2-091	OT-002520	AcGFP - линкер (GS) - CA2 (S56F, D71S) -	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHK FSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKL PVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMK	211067	211103

		линкер (SLDG) - P2A - mCherry	QHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKED GNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAK NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN TPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPN EKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYK GSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAK GERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSY DQATFLRILNNGHAFNVEFSDSQDKAV LKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQG SEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGD FGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPG LQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRG LLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWI VLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPE ELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFKSLD GATNFSLLKQAGDVEENPGPLSKGEED NMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIE GEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPF AWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVT QDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPV MQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGE IKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKP VQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQ YERAEGRHSTGGMDELYK*		
OT-CA2-092	OT-002546	AcGFP - линкер (GS) - CA2 (S73N, R89Y)) - линкер (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHK FSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKL PVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMK QHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKED GNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAK NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN TPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPN EKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYK GSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAK GERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSY DQATSLRILNNGHAFNVEFDDNQDKA VLKGGPLDGTYYLIQFHFHWGSLDGQ GSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG	211068	211104

			DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKP GLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPR GLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTW IVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEP EELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFKSL DGATNFSLLKQAGDVEENPGPLSKGEE DNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEI EGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPF AWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVT QDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPV MQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGE IKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKP VQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQ YERAEGRHSTGGMDELYK*		
OT-CA2-093	OT-002547	AcGFP - линкер (GS) - CA2 (V134F, L228F) - линкер (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHK FSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKL PVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMK QHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKED GNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAK NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN TPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPN EKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYK GSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAK GERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSY DQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKA VLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQ GSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAFQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPG LQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRG LLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWI VLKEPISVSSEQVLKFRKFNFNGEGEPE ELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFKSLD GATNFSLLKQAGDVEENPGPLSKGEED NMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIE GEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPF AWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVT QDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPV	211069	211105

			MQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGE IKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKP VQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQ YERAEGRHSTGGMDELYK*		
OT- CA2-096	OT- 00318 2	AcGFP - линкер (GS) - CA2 (M1del, L156H, A256del, S257del, F258del, K259del) - линкер (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHK FSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKL PVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMK QHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKED GNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAK NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN TPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPN EKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYK GSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAK GERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSY DQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKA VLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQ GSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKP GHQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDP RGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVT WIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEG EPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKSLDG ATNFSLLKQAGDVEENPGPLSKGEEDN MAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEG EGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFA WDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYL KLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQ DSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPVM QKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIK QRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKPV QLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQY ERAEGRHSTGGMDELYK*	21107 0	211106
OT- CA2-097	OT- 00318 3	AcGFP - линкер (GS) - CA2 (M1del, S2del, H3del, H4del, W5del, L156H) - линкер (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHK FSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKL PVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMK QHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKED GNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAK	21107 1	211107

			NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN TPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPN EKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYK GSGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQS PVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATS LRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGG PLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTV DKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAV QQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGHQKVV DVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPES LDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPI SVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVD NWRPAQPLKNRQIKASFKSLDGATNFS LLKQAGDVEENPGPLSKGEEDNMAIIK EFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEG RPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILS PQFMYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPE GFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQ DGEFIYKVKLRGTNFPSDGPVMQKKT MGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLK LKDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPG AYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAE GRHSTGGMDELYK*		
OT-CA2-098	OT-003184	AcGFP - линкер (GS) - CA2 (M1del, W5Y, L156H) - линкер (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHK FSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKL PVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMK QHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKED GNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAK NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN TPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPN EKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYK GSSHHYGYGKHNGPEHWHKDFPIAKG ERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYD QATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAV LKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQG SEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGD FGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPG HQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPR GLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTW	211072	211108

			IVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEP EELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFKSL DGATNFSLLKQAGDVEENPGPLSKGEE DNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEI EGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPF AWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVT QDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPV MQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGE IKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKP VQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQ YERAEGRHSTGGMDELYK*		
OT-CA2-099	OT-003185	AcGFP - линкер (GS) - CA2 (M1del, L156H, G234del, E235del, P236del) - линкер (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHK FSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKL PVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMK QHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKED GNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAK NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN TPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPN EKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYK GSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAK GERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSY DQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKA VLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQ GSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKP GHQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDP RGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVT WIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFKSLDG ATNFSLLKQAGDVEENPGPLSKGEEDN MAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEG EGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFA WDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYL KLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQ DSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPVM QKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIK QRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKPV	211073	211109

			QLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQY ERAEGRHSTGGMDELYK*		
OT-CA2-101	OT-003187	AcGFP - линкер (GS) - CA2 (M1del, L156H, F225L) - линкер (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHK FSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKL PVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMK QHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKED GNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAK NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN TPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPN EKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYK GSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAK GERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSY DQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKA VLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQ GSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKP GHQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDP RGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVT WIVLKEPISVSSEQVLKLRKLNFNGEG EPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK SLDGATNFSLLKQAGDVEENPGPLSKG EEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHE FEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGP LPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIP DYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVT VTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDG PVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALK GEIKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAK KPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIV EQYERAEGRHSTGGMDELYK*	211074	211110
OT-CA2-102	OT-003188	AcGFP - линкер (GS) - CA2 (M1del, D71N, D75N, D101N, L156H) - линкер (SLDG) - P2A - mCherry	MVSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHK FSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKL PVPWPTLVTTLSYGVQCFSRYPDHMK QHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNY KSRAEVKFEGDTLVNRIELTGTDFKED GNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAK NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN TPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPN	211075	211111

			EKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYK GSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAK GERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSY DQATSLRILNNGHAFNVEFNDSQNKA VLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLNGQ GSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYG DFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKP GHQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDP RGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVT WIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEG EPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK SLDGATNFSLLKQAGDVEENPGPLSKG EEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHE FEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGP LPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIP DYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVT VTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDG PVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALK GEIKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAK KPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIV EQYERAEGRHSTGGMDELYK*		

Эффекторные модули CA2 CAR и CA2 IL15

[0356] В одном варианте осуществления, описанные в настоящем документе ДД CA2 могут быть добавлены к одной или более представляющим интерес полезным нагрузкам CAR. Они называются «эффекторными модулями CA2 CAR». В Таблице 10 представлены конструкции CA2 CAR.

Таблица 10: Конструкции CA2 CAR и CA2 IL15

Описание	**Последовательность**	**Амин окисл. SEQ ID NO:**	**Нуклеот. SEQ ID NO:**
OT-001988 (лидерная последовательность CD8α; scFv CD19; петля и	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISC RASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSG SGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGG GSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNS	210692	210693

трансмембранный домен CD8a; костимулирующий домен CD28/внутриклеточный домен 4-1BB; внутриклеточный домен CD3 дзета; линкер (GS); CA2(ак 2-260 ДТ, I59N, G102R); стоп)	KSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGT SVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPRGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIA KGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRNLNNGHAF NVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDRQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKV GSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYW TYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGE PEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK*		
OT-001989 (лидерная последовательность CD8α; scFv CD19; петля и трансмембранный домен CD8a; костимулирующий домен CD28/внутриклеточный домен 4-1BB; внутриклеточный домен CD3 дзета; линкер (GS); CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H); стоп)	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISC RASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSG SGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGG GSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNS KSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGT SVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPRGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIA KGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAF NVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKV GSAKPGHQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYW TYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGE PEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK*	210694	210695
OT-002094 (лидерная последовательность легкой цепи Ig каппа; линкер ((GS)15); IL15 (49-162 ДТ);	MDMRVPAQLLGLLLLWLSGARCNWVNVISDLKKIEDLIQSMH IDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVE NLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQ MFINTSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSKQEHFPD NLLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRGSSHHWGYGK HNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYD QATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHF HWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQ	210874	210875

петля B7-1, трансмембранный домен и хвост; линкер (GS); CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H); стоп)	QPDGLAVLGIFLKVGSAKPGHQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK*		

[0357] В Таблице 11 представлены дополнительные конструкции CA2 CAR.

Таблица 11: CA2 CAR

Описание	**Последовательность**	**Амин окисл. SEQ ID NO:**	**Нуклеот. SEQ ID NO:**
OT-002173 (Met; лидерная последовательность CD8α; scFv CD19; петля CD8α-TM; внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB; сигнальный домен CD3 дзета; линкер (GS); CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, E69V, N231I); стоп)	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNDHAFNVVFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFIGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	211112	211120
OT-002174 (Met; лидерная последовательность CD8α; scFv CD19; петля CD8α-TM;	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGT	211113	211121

внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB; сигнальный домен CD3 дзета; линкер (GS); CA2 (ак 2-260 ДТ, L197P); стоп)	SVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSPTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK		
OT-002175 (Met; лидерная последовательность CD8α; scFv CD19; петля CD8α-TM; внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB; сигнальный домен CD3 дзета; линкер (GS); CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H, S172C, F178Y, E186D); стоп)	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGHQKVVDVLDSIKTKGKCADFTNYDPRGLLPDSLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	211114	211122
OT-002176 (Met; лидерная последовательность CD8α; scFv CD19; петля CD8α-TM; внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB;	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY	211115	211123

сигнальный домен CD3 дзета; линкер (GS); CA2 (ак 2-260 ДТ, R27L, T87I, H122Y, N252D); стоп)	KQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPRGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIA KGELQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAF NVEFDDSQDKAVLKGGPLDGIYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVYWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKV GSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYW TYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGE PEELMVDNWRPAQPLKDRQIKASFK		
OT-002177 (Met; лидерная последовательность CD8α; scFv CD19; петля CD8α-TM; внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB; сигнальный домен CD3 дзета; линкер (GS); CA2 (ак 2-260 ДТ, S56N); стоп)	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISC RASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSG SGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGG GSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNS KSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGT SVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPRGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIA KGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATNLRILNNGHAF NVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKV GSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYW TYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGE PEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	211116	211124
OT-002178 (Met; лидерная последовательность CD8α; scFv CD19; петля CD8α-TM; внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB; сигнальный домен CD3 дзета; линкер	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISC RASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSG SGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGG GSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNS KSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGT SVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPRGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIA	211117	211125

(GS); CA2 (ак 2-260 ДТ, D72F, V241F, P249L); стоп)	KGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAF NVEFDFSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKV GSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYW TYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGE PEELMFDNWRPAQLLKNRQIKASFK		
OT-002179 (Met; лидерная последовательность CD8α; scFv CD19; петля CD8α-TM; внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB; сигнальный домен CD3 дзета; линкер (GS); CA2 (ак 2-260 ДТ, D71L, T87N, L250R); стоп)	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISC RASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSG SGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGG GSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNS KSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGT SVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPRGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIA KGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAF NVEFLDSQDKAVLKGGPLDGNYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKV GSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYW TYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGE PEELMVDNWRPAQPRKNRQIKASFK	211118	211126
OT-002180 (Met; лидерная последовательность CD8α; scFv CD19; петля CD8α-TM; внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB; сигнальный домен CD3 дзета; линкер (GS); CA2 (ак 2-260 ДТ, L183S); стоп)	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISC RASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSG SGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGG GSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNS KSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGT SVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPRGSSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIA KGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAF NVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHT VDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKV	211119	211127

	GSAKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGSLPESLDYW TYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGE PEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK		

Эффекторные модули CA2 CD40L

[0358] В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе ДД CA2 могут быть присоединены к CD40L. В Таблице 13 представлен примерный ДД CA2, присоединенный к CD40L. В Таблице 12 представлены компоненты конструкции для получения CD40L-регулируемой конструкции CA2, как указано в Таблице 13. В Таблице 13 «*» обозначает трансляцию стоп-кодона.

Таблица 12. Компоненты конструкции CA2 CD40L

Компонент	**Аминокисл. SEQ ID NO:**	**Нуклеот. SEQ ID NO:**
Линкер (GGSGGGSGGGSG)	210882	210883
CD40L	13148	210920
CA2 (L156H)	210602	210603

Таблица 13. Конструкции CA2 CD40L

ID	**Аминокисл. последовательность**	**Аминокисл. SEQ ID NO:**	**Нуклеот. SEQ ID NO:**
OT-001990 (CA2 (L156H); линкер (GGSGGGSGGGSG); CD40L; стоп)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTA KYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKA VLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYA AELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAK PGHQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWT YPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGE GEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFKGGSGGGSGGGS GMIETYNQTSPRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSA LFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSL SLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQ NPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYYTMSNNLVTLEN GKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKS PGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASV FVNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL*	210927	210928

CA2 mbIL12 с эффекторными модулями CAR

[0359] В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе ДД CA2 могут быть присоединены к мембраносвязанному IL12, далее именуемому «mbIL12». В Таблице 15 приведены ДД CA2, добавленные к полезной нагрузке mbIL12. Такие эффекторные модули могут быть дополнительно функционально связаны с любым из CAR, описанных в настоящем документе. Мембрано-ассоциированные конструкции IL12 в тандеме с CAR CD19 представлены в Таблице 15. Любой из ДД, описанных в настоящем документе, может быть объединен с компонентами конструкции из Таблицы 14 для получения регулируемых мембраносвязанных конструкций IL12, перечисленных в Таблице 15. В Таблице 15 «*» обозначает трансляцию стоп кодона

Таблица 14. CA2 mbIL2 с компонентами конструкции CAR

Компонент	**Аминокисл. SEQ ID NO:**	**Нуклеот. SEQ ID NO:**
Лидерная последовательность CD8a	207570	207571
Лидерная последовательность IL12b (p40)	207912	207918
Линкер (GS)	GS	GGATCA; GGATCC
Линкер (G4S)3	208369	208373
Линкер (GS)15	210880	210881
scFV CD19	205092	205098
Петля и трансмембранный домен CD8a	205909	205910; 205911
Внутриклеточный домен 4-1BB	206147	206154
Внутриклеточный домен CD3 дзета	206033	206039
Сайт расщепления P2A	208337	208338
IL12B (p40) (23-328 ДТ)	210884	210890
IL12A (p35) (57-253 ДТ)	210898	210907
CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, G102R)	210598	210599
CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H)	210600	210601
CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, E69V, N231I)	210748	210749
CA2 (ак 2-260 ДТ, R27L, T87I, H122Y, N252D)	210702	210703

Таблица 15. CA2 mbIL2 с конструкциями CAR

ID	**Аминокисл. последовательность**	**Аминокисл. SEQ ID NO:**	**Нуклеот. SEQ ID NO:**

OT-002007 (лидерная последовательность CD8a; scFV CD19; петля и трансмембранный домен CD8a; внутриклеточный домен 4-1BB; внутриклеточный домен CD3 дзета; линкер (GS) (сайт BamH1); сайт расщепления P2A; лидерная последовательность IL12b (p40); IL12B (p40) (23-328 ДТ); линкер ((G4S)3); IL12A (p35) (57-253 ДТ); линкер ((GS)15); петля и трансмембранный домен CD8a; внутриклеточный домен 4-1BB; линкер (GS) (сайт BamH1); CA2 (ак 2-260 ДТ, I59N, G102R); стоп (TGA))	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDR VTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSG VPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYT FGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVA PSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVI WGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDD TAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAP RPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSATNFSLLKQA GDVEENPGPMCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKD VYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSS EVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTC WWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVR GDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLK YENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYP DTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSAT VICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGG GGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNM LQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELT KNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDL KMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQ ALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTI DRVMSYLNASGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGS GSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCGSSHHWG YGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSL KPLSVSYDQATSLRNLNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKG GPLDGTYRLIQFHFHWGSLDRQGSEHTVDKKKYAAEL HLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPG LQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTY PGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGE GEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK*	2109 49	2109 50
OT-002008 (лидерная	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDR VTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSG	2109 51	2109 52

последовательность CD8a; scFV CD19; петля и трансмембранный домен CD8a; внутриклеточный домен 4-1BB; внутриклеточный домен CD3 дзета; линкер (GS) (сайт BamH1); сайт расщепления P2A; лидерная последовательность IL12b (p40); IL12B (p40) (23-328 ДТ); линкер ((G4S)3); IL12A (p35) (57-253 ДТ); линкер ((GS)15); петля и трансмембранный домен CD8a; внутриклеточный домен 4-1BB; линкер (GS) (сайт BamH1); CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H); стоп (TGA))	VPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYT FGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVA PSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVI WGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDD TAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAP RPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSATNFSLLKQA GDVEENPGPMCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKD VYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSS EVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTC WWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVR GDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLK YENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYP DTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSAT VICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGG GGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNM LQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELT KNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDL KMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQ ALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTI DRVMSYLNASGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGS GSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCGSSHHWG YGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSL KPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGG PLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHL VHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGHQ KVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPG SLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGE PEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK*		
OT-002009 (лидерная последовательность CD8a;	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDR VTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSG VPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYT FGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVA	210953	210954

scFV CD19; петля и трансмембранный домен CD8a; внутриклеточный домен 4-1BB; внутриклеточный домен CD3 дзета; линкер (GS) (сайт BamH1); сайт расщепления P2A; лидерная последовательность IL12b (p40); IL12B (p40) (23-328 ДТ); линкер ((G4S)3); IL12A (p35) (57-253 ДТ); линкер ((GS)15); петля и трансмембранный домен CD8a; внутриклеточный домен 4-1BB; линкер (GS) (сайт BamH1); CA2 (ак 2-260 ДТ, L156H); стоп (TGA))	PSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVI WGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDD TAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAP RPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSATNFSLLKQA GDVEENPGPMCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKD VYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSS EVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTC WWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVR GDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLK YENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYP DTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSAT VICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGG GGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNM LQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELT KNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDL KMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQ ALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTI DRVMSYLNASGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGS GSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCGSSHHWG YGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSL KPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGG PLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHL VHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGHQ KVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPG SLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGE PEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK*		
OT-002010 (лидерная последовательность CD8a; scFV CD19; петля и	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDR VTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSG VPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYT FGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVA PSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVI WGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDD	210955	210956

трансмембранный домен CD8a; внутриклеточный домен 4-1BB; внутриклеточный домен CD3 дзета; линкер (GS) (сайт BamH1); сайт расщепления P2A; лидерная последовательность IL12b (p40); IL12B (p40) (23-328 ДТ); линкер ((G4S)3); IL12A (p35) (57-253 ДТ); линкер ((GS)15); петля и трансмембранный домен CD8a; внутриклеточный домен 4-1BB; линкер (GS) (сайт BamH1); CA2 (ак 2-260 ДТ, G63D, E69V, N231I); стоп (TGA))	TAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAP RPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSATNFSLLKQA GDVEENPGPMCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKD VYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSS EVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTC WWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVR GDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLK YENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYP DTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSAT VICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGG GGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNM LQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELT KNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDL KMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQ ALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTI DRVMSYLNASGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGS GSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCGSSHHWG YGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSL KPLSVSYDQATSLRILNNDHAFNVVFDDSQDKAVLKGG PLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHL VHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQ KVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPG SLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFIGEGEP EELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK*		
OT-002012 (лидерная последовательность CD8a; scFV CD19; петля и трансмембранн	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDR VTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSG VPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYT FGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVA PSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVI WGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDD TAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAP	210957	210958

ый домен CD8a; внутриклеточный домен 4-1BB; внутриклеточный домен CD3 дзета; линкер (GS) (сайт BamH1); сайт расщепления P2A; лидерная последовательность IL12b (p40); IL12B (p40) (23-328 ДТ); линкер ((G4S)3); IL12A (p35) (57-253 ДТ); линкер ((GS)15); петля и трансмембранный домен CD8a; внутриклеточный домен 4-1BB; линкер (GS) (сайт BamH1); CA2 (ак 2-260 ДТ, R27L, T87I, H122Y, N252D); стоп (TGA))	RPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSATNFSLLKQA GDVEENPGPMCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKD VYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSS EVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTC WWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVR GDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLK YENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYP DTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSAT VICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGG GGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNM LQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELT KNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDL KMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQ ALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTI DRVMSYLNASGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGS GSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCGSSHHWG YGKHNGPEHWHKDFPIAKGELQSPVDIDTHTAKYDPSL KPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGG PLDGIYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHL VYWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQ KVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPG SLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGE PEELMVDNWRPAQPLKDRQIKASFK*		
OT-001895 (лидерная последовательность CD8a; scFv CD19; петля и трансмембранный домен CD8a;	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDR VTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSG VPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYT FGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVA PSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVI WGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDD TAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAP	210959	210960

внутриклеточный домен 4-1BB (костимулирующий домен CD28); внутриклеточный домен CD3 дзета; линкер (GS); сайт расщепления P2A; лидерная последовательность IL12B; субъединица бета интерлейкина-12 (p40) (23-328 ДТ); линкер (G4S)3; субъединица альфа интерлейкина-12 (p35) (57-253 ДТ); линкер ((GS)15); петля и трансмембранный домен CD8a; линкер (GS); стоп)	RPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSATNFSLLKQA GDVEENPGPMCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKD VYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSS EVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTC WWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVR GDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLK YENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYP DTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSAT VICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGG GGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNM LQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELT KNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDL KMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQ ALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTI DRVMSYLNASGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGS GSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCGS*		
OT-002113 (лидерная последовательность CD8a; scFV CD19; петля и трансмембранный домен CD8a; внутриклеточный сигнальный	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDR VTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSG VPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYT FGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVA PSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVI WGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDD TAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAP RPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY	210961	210962

домен 4-1BB; сигнальный домен CD3 дзета; линкер (GS); сайт расщепления P2A; Met; лидерная последовательность субъединицы бета интерлейкина-12 (p40); IL12B (p40) (23-328 ДТ); линкер ((G4S)3); IL12A (p35) (57-253 ДТ); линкер (GS)15; петля CD8a; трансмембранный домен CD8a; линкер (GS); CA2 (ак 2-260 ДТ); стоп)	KQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSATNFSLLKQA GDVEENPGPMCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKD VYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSS EVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTC WWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVR GDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLK YENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYP DTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSAT VICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGG GGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNM LQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELT KNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDL KMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQ ALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTI DRVMSYLNASGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGS GSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCGSSHHWG YGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSL KPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGG PLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHL VHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAKPGLQ KVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPG SLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEGE PEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK*		

II. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ И СОСТАВЫ

[0360] Настоящее изобретение также включает фармацевтические композиции, включающие один или более стимулов, биоциклы CA2, эффекторные модули CA2 или системы по настоящему изобретению, и, необязательно, по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент или инертный ингредиент.

[0361] Как используется в настоящем документе, термин «фармацевтическая композиция» относится к препарату одного или более биоциклов CA2 или компонентов, описанных в настоящем документе, или их фармацевтически приемлемых солей, необязательно с другими химическими компонентами, такими как физиологически подходящие носители и эксципиенты.

[0362] Термин «эксципиент» или «неактивный ингредиент» относится к инертному или неактивному веществу, добавленному в фармацевтическую композицию для дальнейшего облегчения введения соединения. Неограничивающие примеры таких инертных ингредиентов раскрыты в разделе «Составы».

[0363] В некоторых вариантах осуществления композиции вводят людям, пациентам или субъектам. Для целей настоящего изобретения фраза «активный ингредиент» в целом относится к любому одному или более компоненту биоцикла CA2, который должен быть доставлен, как описано в настоящем документе.

[0364] Хотя описание фармацевтических композиций, представленных в настоящем документе, в основном направлено на фармацевтические композиции, которые подходят для введения людям, специалисту в данной области будет понятно, что такие композиции в целом подходят для введения любым другим животным, например, животным, не являющимся человеком, например, млекопитающим, не являющимся человеком. Субъекты, которым предполагается введение фармацевтических композиций, включают млекопитающих, не являющихся человеком, включая сельскохозяйственных животных, таких как крупный рогатый скот, лошади, куры и свиньи, домашних животных, таких как кошки, собаки, или исследовательских животных, таких как мыши, крысы, кролики, собаки и приматы, не являющиеся человеком, но не ограничиваются ими.

[0365] Фармацевтическая композиция в соответствии с изобретением может быть приготовлена, упакована и/или продана оптом, в виде единичной стандартной дозы и/или в виде множества единичных стандартных доз. Как используется в настоящем документе, «единичная стандартная доза» - это дискретное количество фармацевтической композиции, включающее заранее определенное количество активного ингредиента. Количество активного ингредиента обычно равно дозе активного ингредиента, которую можно было бы ввести субъекту, и/или удобной части такой дозы, такой как, например, половина или треть такой дозы.

[0366] Относительные количества активного ингредиента, фармацевтически приемлемого эксципиента или инертного ингредиента и/или любых дополнительных ингредиентов в фармацевтической композиции в соответствии с изобретением будут варьироваться в зависимости от личности, размера и/или состояния лечащегося субъекта и дополнительно в зависимости от способа введения композиции. В качестве примера, композиция может включать от 0,1% до 100%, например, от 0,5 до 50%, от 1-30%, от 5-80%, по меньшей мере 80% (масс./масс.) активного ингредиента.

[0367] Эффективность лечения или ослабления заболевания можно оценить, например, путем измерения прогрессирования заболевания, ремиссии заболевания, выраженности симптомов, уменьшения боли, качества жизни, дозы лекарства, необходимой для поддержания эффекта лечения, уровня маркера заболевания или любого другого измеряемого параметра, подходящего для данного заболевания, которое лечится или направлено на профилактику. Специалисты в данной области могут контролировать эффективность лечения или профилактики путем измерения любого из таких параметров или любой их комбинации. В связи с применением композиций по настоящему изобретению, «эффективный в отношении» например, рака, указывает на то, что введение клинически приемлемым способом приводит к положительному эффекту, по меньшей мере, для статистически значимой части пациентов, например, к улучшению симптомов, излечению, снижению нагрузки заболевания, уменьшению массы опухоли или количества клеток, продлению жизни, улучшению качества жизни или другому эффекту, обычно признаваемому положительным врачами, знакомыми с лечением конкретного типа рака.

[0368] Лечебный или профилактический эффект очевиден, когда наблюдается статистически значимое улучшение одного или более параметров состояния болезни или отсутствие ухудшения или развития

симптомов там, где в противном случае их можно было бы ожидать. В качестве примера, благоприятное изменение измеряемого параметра заболевания по меньшей мере на 10%, а предпочтительно по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50% или более может свидетельствовать об эффективном лечении. Эффективность данной композиции или состава по настоящему изобретению также может быть оценена с использованием экспериментальной животной модели для данного заболевания, как известно в данной области. При использовании экспериментальной животной модели эффективность лечения подтверждается, когда наблюдаются статистически значимые изменения.

Составы

[0369] Композиции по настоящему изобретению могут быть получены любым способом, подходящим для доставки. Состав может включать, без ограничения, наночастицы, микросферы сополимера молочной и гликолевой кислоты (PLGA), липидоиды, липоплекс, липосомы, полимеры, углеводы (включая простые сахара), катионные липиды и их комбинации.

[0370] В одном варианте осуществления состав представляет собой наночастицу, которая может включать в себя по меньшей мере один липид. Липид может быть выбран из DLin-DMA, DLin-K-DMA, 98N12-5, C12-200, DLin-MC3-DMA, DLin-KC2-DMA, DODMA, PLGA, ПЭГ, ПЭГ-DMG и ПЭГилированных липидов, но не ограничен ими. В другом аспекте липид может быть катионным липидом, таким как DLin-DMA, DLin-D-DMA, DLin-MC3-DMA, DLin-KC2-DMA и DODMA, но не ограничен ими.

[0371] Для полинуклеотидов по изобретению состав может быть выбран из любого из тех, что описаны, например, в международной заявке PCT/US2012/069610, содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Неактивные ингредиенты

[0372] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические или другие составы могут включать по меньшей мере один эксципиент, который является неактивным ингредиентом. Как используется в настоящем документе, термин «неактивный ингредиент» относится к одному или более неактивным агентам, включенным в составы. В некоторых вариантах осуществления все, ни один или некоторые из неактивных ингредиентов, которые могут быть использованы в составах по настоящему изобретению, могут быть одобрены Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA).

III. ДОЗИРОВАНИЕ, ДОСТАВКА И ВВЕДЕНИЕ

[0373] Композиции по изобретению могут быть доставлены в клетку или субъекту одним или более путями и способами. Вирусные векторы, содержащие один или более биоциклов CA2, эффекторные модули CA2, SRE, полезные нагрузки и другие компоненты, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для их доставки в клетку и/или субъекту. Могут использоваться и другие формы, такие как мРНК, плазмиды, а также рекомбинантные белки.

Доставка

«Голая» доставка

[0374] Фармацевтические композиции, биоциклы CA2, компоненты биоциклов CA2, эффекторные модули CA2, включая их SRE, или полезные нагрузки по настоящему изобретению могут быть доставлены в клетки, ткани, органы и/или организмы в «голом» виде. Как используется в настоящем документе, термин «голый» относится к фармацевтическим композициям, биоциклам CA2, компонентам биоцикла CA2,

эффекторным модулям CA2, включая их SRE или полезные нагрузки, доставляемые без агентов или модификаций, которые способствуют трансфекции или проницаемости. «Голые» фармацевтические композиции, биоциклы CA2, компоненты биоциклов CA2, эффекторные модули CA2, включая их SRE или полезные нагрузки, могут быть доставлены в клетки, ткани, органы и/или организмы с использованием путей введения, известных в данной области и описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления «голая» доставка может включать состав в простом буфере, таком как физраствор или ФСБ.

Доставка в составе

[0375] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, биоциклы CA2, компоненты биоциклов CA2, эффекторные модули CA2, включая их SRE, или полезные нагрузки по настоящему изобретению могут быть получены с использованием способов, описанных в настоящем документе. Составы могут содержать фармацевтические композиции, биоциклы CA2, компоненты биоциклов CA2, эффекторные модули CA2, включая их SRE или полезные нагрузки, которые могут быть модифицированными и/или немодифицированными. Составы могут дополнительно включать агенты проникновения в клетки, фармацевтически приемлемые носители, агенты доставки, биоэродируемые или биосовместимые полимеры, растворители и/или депо доставки с замедленным высвобождением, но не ограничиваются этим. Составы по настоящему изобретению могут быть доставлены в клетки с использованием путей введения, известных в данной области и описанных в настоящем документе.

[0376] Фармацевтические композиции, биоциклы CA2, компоненты биоциклов CA2, эффекторные модули CA2, включая их SRE или полезные нагрузки, могут быть также разработаны для прямой доставки в органы или ткани любым из нескольких известных способов, включая прямое замачивание или промывание, через катетер, с помощью гелей, порошков, мазей, кремов, гелей, лосьонов и/или капель, с помощью субстратов, таких как ткань или биоразлагаемые материалы, покрытые или пропитанные композициями, и тому подобное, но не ограничиваясь ими.

Доставка в клетки

[0377] В другом аспекте изобретению, полинуклеотиды, кодирующие биоциклы CA2, эффекторные модули CA2, SRE (например, ДД CA2), представляющие интерес полезные нагрузки (например, иммунотерапевтические агенты), композиции по изобретению и векторы, включающие указанные полинуклеотиды, могут быть введены в клетки. В качестве неограничивающего примера, клетки могут быть эффекторными иммунными клетками.

[0378] В одном аспекте изобретения, полинуклеотиды, кодирующие биоциклы CA2, эффекторные модули CA2, SRE (например, ДД CA2), полезные нагрузки, представляющие интерес (например, иммунотерапевтические агенты) и композиции по изобретению, могут быть упакованы в вирусные векторы или интегрированы в вирусные геномы, позволяющие переходную или стабильную экспрессию полинуклеотидов. Предпочтительными вирусными векторами являются ретровирусные векторы, включая лентивирусные векторы. Для создания ретровирусного вектора полинуклеотидную молекулу, кодирующую биоцикл CA2, эффекторный модуль CA2, ДД CA2 или представляющую интерес полезную нагрузку (например, иммунотерапевтический агент), вставляют в вирусный геном на место определенных вирусных последовательностей для получения вируса, дефектного по репликации. Затем рекомбинантный вирусный вектор вводят в упаковочную клеточную линию, содержащую гены gag, pol и env, но без LTR и упаковочных компонентов. Рекомбинантные ретровирусные частицы выделяют в культуральную среду, затем собирают,

по желанию концентрируют и используют для переноса генов. Особенно предпочтительны лентивирусные векторы, поскольку они способны инфицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки.

[0379] Векторы также могут быть перенесены в клетки невирусными методами с помощью физических методов, таких как иглы, электропорация, сонопорация, гирдопорация; химические носители, такие как неорганические частицы (например, фосфат кальция, кремнезем, золото) и/или химическиеми методами. В некоторых вариантах осуществления для доставки могут быть использованы синтетические или природные биоразлагаемые агенты, такие как катионные липиды, липидные наноэмульсии, наночастицы, векторы на основе пептидов или векторы на основе полимеров.

[0380] В некоторых вариантах осуществления полипептиды по изобретению могут быть доставлены в клетку напрямую. В одном варианте осуществления полипептиды по изобретению могут быть доставлены с помощью синтетических пептидов, включающих домен эндосомального высвобождения (ELD), слитый с доменом проникновения в клетку (CLD). Полипептиды по изобретению вводят в клетку совместно с ELD-CLD-синтетическим пептидом. ELD способствуют высвобождению белков, застрявших в эндосоме, в цитозоль. Такие домены являются производными белков микробного и вирусного происхождения и описаны в данной области. CPD позволяют транспортировать белки через плазматическую мембрану и также описаны в данной области. Слитые белки ELD-CLD синергически увеличивают эффективность трансдукции по сравнению с совместной трансдукцией с одним из доменов. В некоторых вариантах осуществления, богатый гистидином домен может быть добавлен к челночной конструкции в качестве дополнительного способа, позволяющего высвобождение нагрузки из эндосомы в цитозоль. Челнок может также включать остаток цистеина на N- или C-конце для создания мультимеров слитых пептидов. Мультимеры слитых пептидов ELD-CLD, образованные путем добавления остатка цистеина к концу пептида, демонстрируют еще большую эффективность трансдукции по сравнению с конструкциями из одного слитого пептида. Полипептиды по изобретению также могут быть присоединены к соответствующим сигналам локализации для направления нагрузки в соответствующее субклеточное место, например, ядро. В некоторых вариантах осуществления любой из ELD, CLD или синтетических слитых пептидов ELD-CLD, описанных в международных патентных публикациях WO 2016161516 и WO 2017175072, может быть полезен в настоящем изобретении (содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме).

Способы доставки и/или векторы

[0381] Системы биоциклов CA2, эффекторные модули CA2, SRE и/или полезные нагрузки по настоящему изобретению могут быть доставлены с использованием одного или более способов. В настоящем изобретении также предложены векторы, которые упаковывают полинуклеотиды по изобретению, кодирующие биоциклы CA2, эффекторные модули CA2, SRE (например, ДД CA2) и представляющие интерес полезные нагрузки, а также их комбинации. Векторы по настоящему изобретению также могут быть использованы для доставки упакованных полинуклеотидов в клетку, локальный участок ткани или субъект. Эти векторы могут быть любого типа, включая ДНК-векторы, РНК-векторы, плазмиды, вирусные векторы и частицы. Технология вирусных векторов хорошо известна и описана у Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York). Вирусы, которые пригодны в качестве векторов, включают лентивирусные векторы, аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы (AAV), вирусные векторы простого герпеса, ретровирусные векторы, онколитические вирусы и тому подобное, но не ограничиваются этим.

[0382] Как правило, векторы содержат точку начала репликации, функционирующую по меньшей мере в одном организме, последовательность промотора и подходящий сайт рестрикции эндонуклеазы, а также один или более селектируемых маркеров, например, ген лекарственной устойчивости.

[0383] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор экспрессии может включать регуляторные последовательности, такие как кодоны инициации и терминации транскрипции и трансляции, которые специфичны для типа клетки-хозяина, в которую будет введен вектор.

[0384] В некоторых вариантах осуществления вектор по изобретению может включать одну или более полезных нагрузок, описанных в настоящем документе, при этом две или более полезных нагрузок могут быть включены в один эффекторный модуль CA2. В этом случае две или более полезные нагрузки настраиваются одним и тем же стимулом одновременно. В других вариантах осуществления вектор по изобретению может включать два или более эффекторных модулей CA2, где каждый эффекторный модуль CA2 включает различную полезную нагрузку. В этом случае два или более эффекторных модуля CA2 и полезная нагрузка настраиваются разными стимулами, обеспечивая независимую регуляцию двух или более компонентов. В других вариантах осуществления вектор по изобретению может включать один или более эффекторных модулей CA2 и один или более эффекторных модулей, отличных от CA2, где каждый эффекторный модуль CA2 включает различную полезную нагрузку. В этом случае эффекторные модули CA2 и полезная нагрузка настраиваются разными стимулами, обеспечивая независимую регуляцию двух или более компонентов.

Лентивирусные носители/частицы

[0385] В некоторых вариантах осуществления лентивирусные носители/частицы могут быть использованы в качестве средств доставки. Лентивирусы являются подгруппой вирусов семейства *Retroviridae*, названной так потому, что перед интеграцией в геном хозяина требуется обратная транскрипция вирусных РНК-геномов в ДНК. Таким образом, наиболее важными характеристиками лентивирусных носителей/частиц является интеграция их генетического материала в геном клетки-мишени/хозяина. Некоторые примеры лентивирусов включают вирусы иммунодефицита человека: ВИЧ-1 и ВИЧ-2, вирус иммунодефицита обезьян (SIV), вирус иммунодефицита кошек (FIV), вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV), вирус болезни Джембрана (JDV), вирус инфекционной анемии лошадей (EIAV), вирус инфекционной анемии лошадей, вирус висна-маэди и вирус артрита-энцефалита коз (CAEV).

[0386] Как правило, лентивирусные частицы, составляющие средство доставки генов, сами по себе дефектны по репликации (их также называют «самоинактивирующимися»). Лентивирусы способны инфицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки благодаря механизму проникновения через неповрежденную ядерную оболочку хозяина (Naldini L et al., *Curr. Opin. Biotechnol*, 1998, 9: 457-463), но не ограничиваясь ими. Рекомбинантные лентивирусные носители/частицы были получены путем многократного ослабления генов вирулентности ВИЧ, например, гены Env, Vif, Vpr, Vpu, Nef и Tat удалены, что делает вектор биологически безопасным. Соответственно, лентивирусные носители, например, полученные из ВИЧ-1/ВИЧ-2, могут обеспечивать эффективную доставку, интеграцию и долгосрочную экспрессию трансгенов в неделящихся клетках. Как используется в настоящем документе, термин «рекомбинантный» относится к вектору или другой нуклеиновой кислоте, содержащей как лентивирусные последовательности, так и нелентивирусные ретровирусные последовательности.

[0387] Лентивирусные частицы могут быть получены путем совместной экспрессии элементов упаковки вируса и самого генома вектора в клетке-продуценте, например, в клетках HEK293T человека. Эти элементы обычно представлены в трех или четырех отдельных плазмидах. Клетки-продуценты совместно трансфецируются плазмидами, кодирующими лентивирусные компоненты, включая ядро (т.е. структурные белки) и ферментативные компоненты вируса, и белок(ы) оболочки (называемые системами упаковки), и плазмидой, кодирующей геном, включая чужеродный трансген, для переноса в клетку-мишень, самим носителем (также называемым вектором переноса). Как правило, плазмиды или векторы включены в линию клеток-продуцентов. Плазмиды/векторы вводят путем трансфекции, трансдукции или инфекции в линию клеток-продуцентов. Способы трансфекции, трансдукции или инфекции хорошо известны специалистам в данной области. В качестве неограничивающего примера, конструкции упаковки и переноса могут быть введены в линии клеток-продуцентов путем трансфекции фосфатом кальция, липофекции или электропорации, как правило, вместе с доминантным селективным маркером, таким как neo, DHFR, Gln-синтетаза или ADA, с последующим отбором в присутствии соответствующего препарата и выделением клонов.

[0388] Клетка-продуцент производит рекомбинантные вирусные частицы, содержащие чужеродный ген, например, эффекторный модуль CA2 по настоящему изобретению. Рекомбинантные вирусные частицы извлекают из культуральной среды и титруют стандартными методами, используемыми специалистами в данной области. Рекомбинантные лентивирусные носители могут быть использованы для заражения клеток-мишеней.

[0389] Клетки, которые могут быть использованы для получения лентивирусных частиц с высоким титром, могут включать клетки HEK293T, клетки 293G, клетки STAR (Relander et al., *Mol. Ther.*, 2005, 11: 452-459), системы экспрессии FreeStyle™ 293 (ThermoFisher, Waltham, MA) и другие линии клеток-продуцентов на основе HEK293T (например, Stewart et al., *Hum Gene Ther.*_2011, 22(3):357-369; Lee et al., *Biotechnol Bioeng*, 2012, 10996): 1551-1560; Throm et al., *Blood.* 2009, 113(21): 5104-5110; содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме), но не ограничиваются ими.

[0390] В некоторых аспектах белки оболочки могут быть гетерологичными белками оболочки других вирусов, например, белок G вируса везикулярного стоматита (VSV G) или белки оболочки gp64 бакуловируса. Гликопротеин VSV-G может быть выбран, в частности, среди видов, относящихся к роду везикуловирусов: *Вирус Карахаса* (CJSV), *вирус Чандипура* (CHPV), *вирус Кокала* (COCV), *вирус Исфахана* (ISFV), *вирус Мараба* (MARAV), *вирус Пири* (PIRYV), *вирус везикулярного стоматита Алагоас* (VSAV), *вирус везикулярного стоматита Индианы* (VSIV) и *вирус везикулярного стоматита Нью-Джерси* (VSNJV) и/или штаммы, предварительно отнесенные к роду везикуловирусов, как *рабдовирус амура*, *вирус BeAn 157575* (BeAn 157575), *вирус Ботеке* (BTKV), *вирус Кальчаки* (CQIV), *вирус угря американского* (EVA), *вирус Грея Лоджа* (GLOV), *вирус Юрона* (JURY), *вирус Кламат* (KLAV), *вирус Кватта* (KWAV), *вирус Ла-Джойя* (LJV), *вирус Мальпаисского источника* (MSPV), *вирус летучих мышей Горы Элгон* (MEBV), *вирус Перинета* (PERV), *рабдовирус мальков щуки* (PFRV), *вирус Портона* (PORV), *вирус Ради* (RADIV), *вирус весенней виремии карпа* (SVCV), *вирус Тупая* (TUPV), *рабдовирус язвенной болезни* (UDRV) и *вирус Юга Богдановаца* (YBV). gp64 или другой бакуловирусный env-белок может быть получен из нуклеополиэдровируса *Autographa californica* (AcMNPV), вируса ядерного полиэдроза *Anagrapha falcifera*, вируса ядерного полиэдроза *Bombyx mori*, нуклеополиэдровируса *Choristoneura fumiferana*, однокапсидного вируса ядерного

полиэдроза *Orgyia pseudotsugata*, нуклеополиэдровируса *Epiphyas postvittana*, нуклеополиэдровируса *Hyphantria cunea*, вируса ядерного полиэдроза *Galleria mellonella*, вируса Дхори, вируса Тогото, нуклеополиэдровируса *Antheraea pemyi* или вируса Баткена.

[0391] Другие элементы, содержащиеся в лентивирусных частицах, могут включать LTR ретровируса (длинный концевой повтор) на 5' или 3' конце, ретровирусный элемент экспорта, необязательно лентивирусный элемент обратного ответа (RRE), промотор или его активную часть, а также область локус-контроля (LCR) или ее активную часть. Эффекторный модуль CA2 связан с вектором.

[0392] Способы получения рекомбинантных лентивирусных частиц обсуждаются в данной области, например, патентах США № 8846385; 7745179; 7629153; 7575924; 7179903; и 6808905, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[0393] Используемые лентивирусные векторы могут быть выбраны из pLVX, pLenti, pLenti6, pLJM1, FUGW, pWPXL, pWPI, pLenti CMV puro DEST, pLJM1-EGFP, pULTRA, pInducer20, pHIV-EGFP, pCW57.1, pTRPE, pELPS, pRRL и pLionII.

[0394] Лентивирусные носители на основе плазмид или вирусов известны в данной области (см. патенты США № 9260725; 9068199; 9023646; 8900858; 8748169; 8709799; 8420104; 8329462; 8076106; 6013516 и 5994136, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме).

Лентивирусные векторы и клеточная инженерия

[0395] Лентивирусные векторы используют для введения трансгенов в Т-клетки (например, первичные Т-клетки человека или клетки Jurkat) для доклинических исследований и клинического применения, включая недавно одобренные продукты, такие как тисагенлеклейцел (KYMRIAH®) для лечения рецидивирующей/рефрактерной В-клеточной лимфомы. Псевдотипированные лентивирусные векторы третьего поколения VSV-G обеспечивают высокие титры, высокую эффективность трансдукции и безопасность и стали выбранными векторами для конструирования Т-клеток. Не желая быть связанными теорией, Т-клеточная инженерия обычно включает активацию Т-клеток антителами CD3/CD28, затем трансдукцию лентивирусом, а затем размножение клеток, которая может длиться от 5 до 30 дней (например, от 9 до 14 дней или от 9 до 15 дней). В целом, интеграция лентивирусного трансгена может занять более 7 дней для полной стабилизации в Т-клетках (например, первичных Т-клетках человека или клетках Jurkat). Хотя более длительные культуры могут увеличить количество клеток, более длительные культуры также могут изменить фенотип Т-клеток на более дифференцированное состояние. Поэтому продолжительность культуры ex vivo может влиять на персистенцию и эффективность CAR Т-клеток. Например, клетки, культивируемые в течение более короткого времени, могут демонстрировать менее дифференцированный фенотип и могут быть высокоэффективными в доклинических моделях.

[0396] Не желая связывать себя теорией, состояние дифференцировки Т-клеток может влиять на приживление и персистенцию Т-клеток после адоптивного переноса. Ghassemi et al (Reducing *Ex Vivo* Culture Improves the Antileukemic Activity of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells. Cancer Immunol Res; 6(9) Sept. 2018; содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме) описывает дифференциацию первичных Т-клеток человека с течением времени и показали, что ранние собранные CAR

Т-клетки демонстрируют повышенную эффекторную функцию и пролиферацию, а также повышенную активность и персистенцию in vivo.

[0397] Динамика лентивирусов, такая как трансдукция, интеграция и/или кинетика экспрессии лентивирусных трансгенов в Т-клетках (например, первичных Т-клетках человека или клетках Jurkat) ex vivo может влиять на эффективность и долговечность противоопухолевых ответов in vivo. Некоторые типы Т-клеток могут давать разные результаты. Например, клеточная линия Jurkat может не обеспечивать такой динамический диапазон экспрессии, как первичные Т-клетки человека. Методы оценки динамики этих лентивирусов известны в данной области и описаны в настоящем документе.

[0398] В некоторых вариантах осуществления для определения кинетики экспрессии трансгена активированные CD3/CD28 первичные Т-клетки человека могут быть трансдуцированы лентивирусом, несущим трансген (например, регулируемый трансген или конститутивный трансген, такой как CAR CD19, IL12, флуоресцентный белок или любой трансген (например, полезная нагрузка), описанный в настоящем документе). Клетки могут быть проанализированы методами, описанными в настоящем документе и/или известными в данной области, на жизнеспособность, интеграцию вирусного генома (например, с помощью количественной ПЦР), уровни транскриптов (например, с помощью количественной ПЦР в реальном времени) и экспрессию трансгена на поверхности клеток, если это применимо (например, если трансген представляет собой или включает CD19 CAR, то может быть оценена экспрессия CD19 CAR на поверхности). Клетки могут быть проанализированы до трансдукции и/или после трансдукции, например, через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 день, 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 или более 30 дней после трансдукции.

[0399] В некоторых вариантах осуществления активированные CD3/CD28 первичные Т-клетки человека могут быть реактивированы с помощью шариков CD3/CD28 после трансдукции. Клетки могут быть реактивированы через 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 день, 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 или более 30 дней после трансдукции. Клетки могут быть проанализированы методами, описанными в настоящем документе и/или известными в данной области, на жизнеспособность, интеграцию вирусного генома (например, с помощью количественной ПЦР), уровни транскриптов (например, с помощью количественной ПЦР в реальном времени) и экспрессию трансгена на поверхности клеток, если это применимо (например, если трансген представляет собой или включает CD19 CAR, то может быть оценена экспрессия CD19 CAR на поверхности), количество копий и/или уровни мРНК.

[0400] В некоторых вариантах осуществления жизнеспособность клеток активированных первичных Т-клеток человека, трансдуцированных лентивирусом, несущим трансген, составляет более 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 99%. В качестве неограничивающего примера жизнеспособность клеток составляет более 90%. В качестве неограничивающего примера жизнеспособность клеток составляет более 85%.

[0401] В некоторых вариантах осуществления жизнеспособность клеток Jurkat, трансдуцированных лентивирусом, несущим трансген, составляет более 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 99%. В

качестве неограничивающего примера жизнеспособность клеток составляет более 90%. В качестве неограничивающего примера жизнеспособность клеток составляет более 85%.

[0402] В некоторых вариантах осуществления интеграция трансгена в геном клетки может быть на уровне или выше точки насыщения. В качестве неограничивающего примера, точка насыщения может составлять 3 копии на клетку.

[0403] В некоторых вариантах осуществления интеграция трансгена в геном может быть высокой в начальные оцениваемые временные точки, а затем снижаться до более низкого значения интеграции, прежде чем стать стабильной для оставшейся части культуры. В качестве неограничивающего примера, интеграция может достигать 20 копий трансгена в геном на клетку в течение ранних временных точек, затем снижаться до 2 копий на клетку и оставаться стабильной в течение оставшейся части культуры.

[0404] В некоторых вариантах осуществления можно оценить способность Т-клеток к трансдукции. Т-клетки по меньшей мере от одного донора могут быть трансдуцированы лентивирусом, содержащим трансген, в дозе, которая, как прогнозируется, достигнет уровней насыщения (например, достаточно вируса, чтобы каждая клетка содержала копию, если ожидается распределение Пуассона), и более высокой дозой лентивируса, которая превышает насыщение в 5 раз. Копии на клетку, процент и СИФ клеток (или концентрация в среде трансгена) могут быть определены для того, чтобы определить, все ли клетки экспрессируют трансген. В качестве неограничивающего примера, Т-клетки от двух разных доноров могут быть трансдуцированы лентивирусом, включающим трансген. Трансдукция может проводиться в двух дозах, насыщения и 5-кратного насыщения, и показать, что через 5-10 дней после трансдукции все группы могут достичь или превысить прогнозируемый уровень насыщения интегрированного трансгена и сходную интенсивность экспрессии по группам, но не все клетки экспрессируют трансген. Не все Т-клетки могут иметь одинаковую восприимчивость к трансдукции, даже если они получены от одного и того же донора. Доля общих клеток, экспрессирующих GFP (выше порога обнаружения), может варьироваться между донорами, партиями и/или дозой вируса. Процент общего количества клеток, экспрессирующих GFP, от одного донора может составлять от 70% до 95%.

[0405] В некоторых вариантах осуществления процент культивированных Т-клеток (например, первичных Т-клеток человека и/или клеток Jurkat) может экспрессировать трансген. Процент Т-клеток культуры, экспрессирующих трансген, может составлять 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или превышать 99%, но не ограничивается этим. В качестве неограничивающего примера, процент может быть больше 70%. В качестве неограничивающего примера, процент может быть больше 75%. В качестве неограничивающего примера, процент может быть больше 80%. В качестве неограничивающего примера, процент может быть больше 85%. В качестве неограничивающего примера, процент может быть больше 90%. В качестве неограничивающего примера, процент может быть больше 95%.

[0406] В некоторых вариантах осуществления уровень мРНК из культуры может снижаться в течение всего периода исследования. Снижение может не ограничиваться конкретным трансгеном, и тенденция может наблюдаться в нескольких классах экспрессируемых белков. Для повышения уровня мРНК клетки могут быть реактивированы после снижения уровня мРНК по сравнению с исходным уровнем. Клетки могут быть реактивированы через 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15

дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 день, 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 или более 30 дней после трансдукции.

[0407] В некоторых вариантах осуществления поверхностная экспрессия из культуры может снижаться в течение всего периода исследования. Например, поверхностная экспрессия может снижаться в период с 3-го по 13-й день, с 3-го по 14-й день или с 3-го по 15-й день после трансдукции. Для увеличения поверхностной экспрессии клетки могут быть реактивированы после снижения поверхностной экспрессии по сравнению с исходным уровнем. Клетки могут быть реактивированы через 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 день, 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 или более 30 дней после трансдукции.

[0408] В некоторых вариантах осуществления трансген представляет собой CAR, такой как CAR CD19, но не ограничиваясь этим. В качестве неограничивающего примера, CAR представляет собой CAR CD19. Жизнеспособность клеток может превышать 90% в клетках, трансдуцированных CAR CD19. Жизнеспособность клеток может превышать 85% в клетках, трансдуцированных CAR CD19. Если клетки являются первичными Т-клетками, трансдуцированными CAR CD19, то количество жизнеспособных клеток может увеличиваться в течение первых временных точек, а затем уменьшаться. Если клетки являются клетками Jurkat, трансдуцированными CAR CD19, то количество жизнеспособных клеток может увеличиваться в течение как минимум 10 дней. Количество копий на клетку для клеток, трансдуцированных CAR CD19, может быть выше в начальные временные точки, а затем снижаться на 50% или более в более поздние временные точки. Экспрессия CAR CD19 на поверхности клеток может снижаться в ходе исследования с около 20000 CAR СИФ до менее чем 5000 CAR СИФ в течение 10 дней (например, с 3-го по 13-й день). После повторной стимуляции на 15-й день СИФ может увеличиться до уровня выше 5000 CAR. Процент первичных Т-клеток человека, экспрессирующих CAR, может составлять от 40% до 60% в течение 3-13 дней после трансдукции. Процент клеток Jurkat, экспрессирующих CAR, может составлять от 30% до 70% в течение 3-13 дней после трансдукции. Первоначальное снижение примерно на 20% может наблюдаться между 3 и 6 днями после трансдукции. Рестимуляция Т-клеток может увеличить процент CAR-положительных клеток до исходного уровня (например, около 60%).

[0409] В некоторых вариантах осуществления трансген кодирует флуоресцентный белок, например, цитозольный зелёный флуоресцентный белок (GFP), люциферазу и mCherry, но не ограничиваясь ими. В качестве неограничивающего примера флуоресцентный белок представляет собой GFP. Жизнеспособность клеток может превышать 90% в клетках, трансдуцированных GFP Жизнеспособность клеток может превышать 85% в клетках, трансдуцированных GFP Если клетки являются первичными Т-клетками, трансдуцированными GFP то В количество жизнеспособных клеток может увеличиваться в течение первых временных точек, а затем уменьшаться. Если клетки являются клетками Jurkat, трансдуцированными GFP то количество жизнеспособных клеток может увеличиваться в течение как минимум 10 дней. Количество копий на клетку для клеток, трансдуцированных GFP, может быть выше в начальные временные точки, а затем снижаться на 50% или более в более поздние временные точки. Экспрессия на поверхности клеток может иметь устойчивое и быстрое снижение, достигающее нижнего значения на 10-й день, с небольшим повышением в случае рестимуляции. Самый высокий уровень экспрессии GFP на клеточной поверхности в клетках Jurkat может быть на 10-й день (около 35000 GFP СИФ), после чего он снижается в течение оставшейся части исследования. Процент первичных Т-клеток человека, экспрессирующих GFP, может

составлять около 80% в течение 3-13 дней после трансдукции. Процент клеток Jurkat, экспрессирующих GFP, может составлять около 90% в течение 3-13 дней после трансдукции.

[0410] В некоторых вариантах осуществления лентивирусные клетки, описанные в настоящем документе, имеют интеграцию геномной ДНК, которая стабилизируется после первоначального снижения количества копий, снижение уровня РНК и поверхностной экспрессии с течением времени, а также повышение уровня РНК и поверхностной экспрессии после повторной стимуляции.

[0411] В некоторых вариантах осуществления лентивирусные сконструированные клетки могут быть оценены с помощью следующего 14-дневного способа, при котором образцы собирают 5 раз на протяжении всей культуры. На 1-й день Т-клетки (например, первичные Т-клетки человека или клетки Jurkat) можно разморозить и добавить шарики CD3/CD28. В день 0 добавляют лентивирус для каждого из условий (например, 4 мл клеток при 0,5e6/мл) и проводят контроль нетрансдуцированных клеток. Удваивают объем среды до 8 мл в 1-й день, а затем удваивают объем среды до 16 мл во 2-й день. На 3-й день собирают 4 мл, а на 4-й день удваивают объем среды до 24 мл. Собирают 4 мл на 6-й день перед удвоением объема среды до 40 мл. Клетки можно разделить (например, 14 мл 0,5e6 клеток/мл) на 8-й день, а затем на 6-й день собрать 4 мл перед удвоением среды до 40 мл. На 10-й день можно собрать 4 мл до увеличения объема среды вдвое - до 20 мл. На 13-й день собирают 4 мл, после чего удваивают объем среды до 32 мл. Культуру делят пополам и половину культуры активируют (шарики для активации CD3/CD28 1:1) и стимулируют в течение ночи. На 14-й день собирают по 4 мл стимулированных и нестимулированных клеток и заканчивают культивирование. Количество копий трансгенов на клетку определяют путем сбора клеток и извлечения геномной ДНК, затем количественно определяют с помощью стандартной кривой кПЦР в отношении эндогенного генома и в отношении последовательности трансгена, затем переводят обнаруженные количества в соотношение. Средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) оценивается по FLO на приборе Attune с соответствующим окрашиванием для каждой группы. Процент экспрессии также может быть оценен по FLO на аттенюаторе, количественно определяющем процент клеток, флуоресцирующих выше порогового значения. Растворимые полезные нагрузки могут быть определены количественно путем сбора супернатанта культуры в каждой отмеченной временной точке и проведения анализа на пластинах MesoScale Discovery (MSD) с последующей нормализацией для плотности клеток.

Аденоассоциированные вирусные частицы

[0412] Доставка любого из биоциклов CA2, компонентов биоциклов CA2, эффекторных модулей CA2, SRE или представляющих интерес полезных нагрузок по настоящему изобретению, может быть достигнута с помощью рекомбинантных аденоассоциированных вирусных векторов (rAAV). Такие векторы или вирусные частицы могут быть сконструированы для использования любого из известных серотипов капсидов или комбинаций серотипов капсидов.

[0413]

[0414] Векторы AAV включают не только одноцепочечные векторы, но и самокомплементарные векторы AAV (scAAV). Векторы scAAV содержат ДНК, которые отжигаются вместе с образованием двухцепочечного векторного генома. Пропуская синтез второй нити, scAAV обеспечивают быструю экспрессию в клетке.

[0415] Векторы rAAV могут быть изготовлены стандартными методами в данной области, например, путем тройной трансфекции, в клетках насекомых sf9 или в суспензионных культурах клеток человека, таких как клетки HEK293.

[0416] Биоциклы CA2, компоненты биоциклов CA2, эффекторные модули CA2, SRE или представляющие интерес полезные нагрузки могут быть закодированы в одном или более вирусных геномах для упаковки в капсиды AAV, описанные в настоящем документе.

[0417] Такие векторные или вирусные геномы могут также включать, помимо по меньшей мере одного или двух ITR (инвертированных концевых повторов), определенные регуляторные элементы, необходимые для экспрессии из векторного или вирусного генома. Такие регуляторные элементы хорошо известны в данной области и включают, например, промоторы, интроны, спейсеры, спейсерные последовательности и тому подобное.

[0418] Биоциклы CA2, компоненты биоциклов CA2, эффекторные модули CA2, SRE или представляющие интерес полезные нагрузки по изобретению, могут быть введены в одной или более частицах AAV.

[0419] В некоторых вариантах осуществления эффекторные модули CA2 могут быть введены в одной или более частицах AAV. В некоторых вариантах осуществления в вирусном геноме может быть закодировано более одного эффекторного модуля CA2 или SRE.

Ретровирусные носители/частицы (γ-ретровирусные векторы)

[0420] В некоторых вариантах осуществления ретровирусные носители/частицы могут быть использованы для доставки биоциклов CA2, компонентов биоциклов CA2, эффекторных модулей CA2, SRE или представляющих интерес полезных нагрузок по настоящему изобретению. Ретровирусные векторы (PB) позволяют постоянно интегрировать трансген в клетки-мишени. Помимо лентивирусных векторов на основе комплекса ВИЧ-1/2, ретровирусные векторы на основе простых гамма-ретровирусов широко используются для доставки терапевтических генов и продемонстрированы в клинических условиях как одна из наиболее эффективных и мощных систем доставки генов, способных трансдуцировать широкий спектр типов клеток. Примеры гамма-ретровирусов включают вирусы мышиной лейкемии (MLV) и вирусы кошачьей лейкемии (FeLV).

[0421] В некоторых вариантах осуществления гамма-ретровирусные векторы, полученные из гамма-ретровирусов млекопитающих, таких как вирусы мышиной лейкемии (MLV), являются рекомбинантными. Семейства MLV гамма-ретровирусов включают экотропное, амфотропное, ксенотропное и политропное подсемейства. Экотропные вирусы способны инфицировать только мышиные клетки с помощью рецептора mCAT-1. Примерами экотропных вирусов являются вирус Молони MLV и AKV. Амфотропные вирусы заражают мышей, людей и другие виды через рецептор Pit-2. Одним из примеров амфотропного вируса является вирус 4070A. Ксенотропные и политропные вирусы используют один и тот же рецептор (Xpr1), но различаются по видовому тропизму. Ксенотропные вирусы, такие как NZB-9-1, заражают человека и другие виды, но не мышиные виды, в то время как политропные вирусы, такие как фокусобразующие вирусы (MCF), заражают мышей, людей и другие виды.

[0422] Гамма-ретровирусные векторы могут быть получены в упаковочных клетках путем совместной трансфекции клеток несколькими плазмидами, включая одну, кодирующую ретровирусный структурный и

ферментативный (gag-pol) полипротеин, одну, кодирующую белок оболочки (env), и одну, кодирующую мРНК вектора, включающую полинуклеотид, кодирующий композиции по настоящему изобретению, которые должны быть упакованы в новообразованные вирусные частицы.

[0423] В некоторых аспектах рекомбинантные гамма-ретровирусные векторы псевдотипированы белками оболочки других вирусов. Гликопротеины оболочки включены в наружный липидный слой вирусных частиц, что может увеличить/изменить тропизм клеток. Примерные белки оболочки включают белок оболочки вируса лейкоза гиббонов (GALV) или белок G вируса везикулярного стоматита (VSV-G), или белок оболочки эндогенного ретровируса обезьян, или белки H и F вируса кори, или белок оболочки gp120 вируса иммунодефицита человека, или белок оболочки кокаловируса (см., например, публикацию заявки в США № 2012/164118; содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). В других аспектах гликопротеины оболочки могут быть генетически модифицированы для включения целевых/связывающих лигандов в гамма-ретровирусные векторы, связывающие лиганды, включая пептидные лиганды, одноцепочечные антитела и факторы роста, но не ограничиваясь этим (Waehler et al., *Nat. Rev. Genet.* 2007, 8(8):573–587; содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). Эти сконструированные гликопротеины могут перенацеливать векторы на клетки, экспрессирующие соответствующие целевые молекулы. В других аспектах для направления векторов в конкретные клетки может быть введен «молекулярный мостик». Молекулярный мостик обладает двойной специфичностью: один конец может распознавать вирусные гликопротеины, а другой конец может связываться с молекулярной детерминантой на клетке-мишени. Такие молекулярные мостики, например, лиганд-рецептор, авидин-биотин и химические конъюгации, моноклональные антитела и сконструированные фузогенные белки, могут направлять прикрепление вирусных векторов к клеткам-мишеням для трансдукции (Yang et al., Biotechnol. *Bioeng*., 2008, 101(2): 357-368 и Maetzig et al., *Viruses*, 2011, 3, 677-713; содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме).

[0424] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные гамма-ретровирусные векторы представляют собой самоинактивирующиеся (SIN) гаммаретровирусные векторы. Векторы некомпетентны к репликации. Векторы SIN могут содержать делецию в области 3' U3, изначально обладающей энхансерной/промоторной активностью. Кроме того, область 5' U3 может быть заменена сильным промотором (необходимым в упаковочной клеточной линии), полученным из цитомегаловируса или RSV, или внутренним промотором по выбору, и/или усиливающим элементом. Выбор внутренних промоторов может быть сделан в соответствии с конкретными требованиями экспрессии генов, необходимыми для конкретной цели изобретения.

[0425] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, кодирующие биоцикл CA2, компоненты биоцикла CA2, эффекторный модуль CA2, SRE, вставляют в рекомбинантный вирусный геном. Другие компоненты вирусной мРНК рекомбинантного гамма-ретровирусного вектора могут быть модифицированы путем вставки или удаления встречающихся в природе последовательностей (например, вставка IRES, вставка гетерологичного полинуклеотида, кодирующего представляющий интерес полипептид или ингибиторную нуклеиновую кислоту, подстановка более эффективного промотора из другого ретровируса или вируса вместо промотора дикого типа и т.п.). В некоторых примерах рекомбинантные гамма-ретровирусные векторы могут включать модифицированный сигнал упаковки, и/или сайт связывания праймера (PBS), и/или 5'-энхансерные/промоторные элементы в U3-области 5'-длинного концевого повтора (LTR), и/или 3'-SIN

элементы, модифицированные в U3-области 3'-LTR. Эти модификации могут повышать титры и способность к заражению.

[0426] Гамма-ретровирусные векторы, пригодные для доставки биоциклов CA2, компонентов биоциклов CA2, эффекторных модулей CA2, SRE или представляющих интерес полезных нагрузок по настоящему изобретению, могут быть выбраны из тех, которые раскрыты в патентах США № 8828718; 7585676; 7351585; публикации заявки США № 2007/048285; публикациях заявок PCT № WO 2010/113037; WO 2014/121005; WO 2015/056014; и европейских патентах № EP 1757702; EP 1757703 (содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме).

Онколитический вирусный вектор

[0427] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды по настоящему изобретению могут быть упакованы в онколитические вирусы. Как используется в настоящем документе, термин «онколитический вирус» относится к вирусу, который преимущественно инфицирует и уничтожает раковые клетки, например, вакцинные вирусы. Онколитический вирус может встречаться в природе или быть генетически модифицированным вирусом, таким как онколитический аденовирус и онколитический вирус герпеса.

[0428] В некоторых вариантах осуществления онколитические вакцинные вирусы могут включать вирусные частицы, дефицитные по тимидинкиназе (ТК), экспрессирующие гранулоцитарно-макрофагальный (GM)-колониестимулирующий фактор (CSF), репликационно-компетентный вектор вируса осповакцины, достаточный для индукции онколизиса клеток в опухоли; см., например, патент США № 9226977; содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Матричная РНК (мРНК)

[0429] В некоторых вариантах осуществления эффекторные модули CA2 по изобретению могут быть сконструированы в виде матричной РНК (мРНК). Как используется в настоящем документе, термин «матричная РНК» (мРНК) относится к любому полинуклеотиду, который кодирует представляющий интерес полипептид и который способен транслироваться для получения кодированного представляющего интерес полипептида in vitro, in vivo, in situ или ex vivo. Такие молекулы мРНК могут иметь структурные компоненты или признаки любого из тех, которые описаны в международной заявке № PCT/US2013/030062, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0430] В некоторых вариантах осуществления эффекторные модули CA2 могут быть сконструированы в виде самоамплифицирующейся РНК. «Самоамплифицирующаяся РНК», как используется в настоящем документе, относится к молекулам РНК, которые могут реплицироваться в организме хозяина, что приводит к увеличению количества РНК и белка, кодируемого РНК. Такая самоамплифицирующаяся РНК может иметь структурные особенности или компоненты из тех, которые описаны в публикации международной патентной заявки № WO 2011005799 (содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте).

Дозирование

[0431] В настоящем изобретении предложены способы, включающие введение любого одного или более компонентов системы биоцикла CA2 субъекту, нуждающемуся в этом. Их можно вводить субъекту в любом количестве и любым способом, эффективным для профилактики, лечения или визуализации заболевания, расстройства и/или состояния (например, заболевания, расстройства и/или состояния, связанного с раком или

аутоиммунным заболеванием). Точное требуемое количество будет варьироваться от субъекта к субъекту, в зависимости от вида, возраста и общего состояния субъекта, серьезности заболевания, конкретной композиции, способа ее введения, способа ее действия и тому подобного.

[0432] Композиции в соответствии с изобретением обычно выпускают в единичной дозированной форме для удобства введения и единообразности дозировки. Однако следует понимать, что общее количество ежедневного использования композиций по настоящему изобретению может быть определено лечащим врачом в рамках обоснованного медицинского заключению. Конкретный терапевтически эффективный, профилактически эффективный или подходящий уровень дозы визуализации для любого конкретного пациента будет зависеть от множества факторов, включая расстройство, подлежащее лечению, и тяжесть расстройства; активность конкретного используемого соединения; конкретный используемый состав; возраст, масса тела, общее состояние здоровья, пол и диета пациента; время введения, способ введения и скорость выведения конкретного используемого соединения; продолжительность лечения; лекарственные средства, используемые в комбинации или одновременно с конкретным применяемым соединением; и подобные факторы, хорошо известные в медицине.

[0433] В некоторых вариантах осуществления композиции по изобретению могут использовать в различных дозах, чтобы избежать истощения Т-клеток, предотвратить синдром высвобождения цитокинов и минимизировать токсичность, связанную с иммунотерапией. Например, низкие дозы композиций по настоящему изобретению могут быть использованы для первоначального лечения пациентов с высокой опухолевой нагрузкой, а пациентов с низкой опухолевой нагрузкой можно лечить высокими и повторяющимися дозами композиций по изобретению для обеспечения распознавания минимальной опухолевой антигенной нагрузки. В другом случае, композиции по настоящему изобретению могут доставлять пульсирующим способом для снижения тонической передачи сигналов Т-клетками и повышения устойчивости *in vivo*. В некоторых аспектах токсичность может быть минимизирована путем первоначального использования низких доз композиций по изобретению, перед введением высоких доз. Дозировка может быть изменена, если в сыворотке крови повышены такие маркеры, как ферритин, С-реактивный белок, IL6, IFN-γ и TNF-α.

[0434] В некоторых вариантах осуществления нейротоксичность может быть связана с терапией CAR или TIL. Такая нейротоксичность может быть связана с CD19-CAR. Токсичность может быть вызвана чрезмерной инфильтрацией Т-клеток в мозг. В некоторых вариантах осуществления нейротоксичность может быть ослаблена путем предотвращения прохождения Т-клеток через гематоэнцефалический барьер. Это может быть достигнуто путем направленной делеции генов эндогенных ингибиторов альфа-4 интегринов, таких как тисабри/натализумаб, также могут быть применимы в настоящем изобретении.

[0435] Также в настоящем документе предложены способы введения лигандов в соответствии с изобретением субъекту, нуждающемуся в этом. Лиганд можно вводить субъекту или в клетки, используя любое количество и любой способ введения, эффективный для настройки биоциклов CA2 по настоящему изобретению. Точное требуемое количество будет варьироваться от субъекта к субъекту, в зависимости от вида, возраста и общего состояния субъекта, серьезности заболевания, конкретной композиции, способа ее введения, способа ее действия и тому подобного. Субъект может быть человеком, млекопитающим или животным. Композиции в соответствии с настоящим изобретением обычно выпускают в стандартных лекарственных формах для удобства введения и единообразности дозировки. Однако следует понимать, что

общее количество ежедневного использования композиций по настоящему изобретению может быть определено лечащим врачом в рамках обоснованного медицинского заключению. В некоторых вариантах осуществления лиганды в соответствии с настоящим изобретением могут вводить в дозах, достаточных для доставки от около 0,0001 мг/кг до около 100 мг/кг, от около 0,001 мг/кг до около 0,05 мг/кг, от около 0,005 мг/кг до около 0,05 мг/кг, от около 0,001 мг/кг до около 0,005 мг/кг, от около 0,05 мг/кг до около 0,5 мг/кг, от около 0,01 мг/кг до около 50 мг/кг, от около 0,1 мг/кг до около 40 мг/кг, от около 0,5 мг/кг до около 30 мг/кг, от около 0,01 мг/кг до около 10 мг/кг, от около 0,1 мг/кг до около 10 мг/кг, или от около 1 мг/кг до около 25 мг/кг, от около 10 мг/кг до около 100 мг/кг, от около 50 мг/кг до около 500 мг/кг, от около 100 мг/кг до около 1000 мг/кг веса тела субъекта в день или несколько раз в день для получения желаемого эффекта. В некоторых вариантах осуществления дозировка может составлять 1 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг, 20 мг/кг, 30 мг/кг, 40 мг/кг, 50 мг/кг, 60 мг/кг, 70 мг/кг, 80 мг/кг, 90 мг/кг, 100 мг/кг, 100 мг/кг, 110 мг/кг, 120 мг/кг, 130 мг/кг, 140 мг/кг, 150 мг/кг, 160 мг/кг, 170 мг/кг, 180 мг/кг, 190 мг/кг или мг/кг массы тела субъекта в день или несколько раз в день для получения желаемого эффекта.

[0436] В настоящем изобретении предложены способы доставки в клетку или ткань любого из описанных в данном документе лигандов, включающие контакт клетки или ткани с указанным лигандом, и могут быть осуществлены in vitro, ex vivo или in vivo. В некоторых вариантах осуществления лиганды в соответствии с настоящим изобретением могут быть введены в клетки в дозах, достаточных для доставки от около 1 нМ до около 10 нМ, от около 5 нМ до около 50 нМ, от около 10 нМ до около 100 нМ, от около 50 нМ до около 500 нМ, от около 100 нМ до около 1000 нМ, от около 1□□ до около 10□М□□от около 5□М до около 50□М от около 10□М до около 100□М от около 25□М до около 250□М от около 50□М до около 500□М. В некоторых вариантах осуществления лиганд может быть введен в клетки в дозах, выбранных из следующих 0,00064□М, 0,0032□М, 0,016□М, 0,08□М, 0,4□М, 1□М 2□М, 10 □М, 50□М, 75, □М, 100□М, 150□М, 175 □М, 200□М, 250□М, но не ограничивается ими.

[0437] Необходимую дозу лигандов по настоящему изобретению можно доставлять только один раз, три раза в сутки, два раза в сутки, один раз в сутки, через сутки, каждые третьи сутки, каждую неделю, каждые две недели, каждые три недели или каждые четыре недели. В некоторых вариантах осуществления желаемая доза может быть доставлена с использованием нескольких способов введения (например, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, одиннадцати, двенадцати, тринадцати, четырнадцати или более введений). Когда применяют несколько введений, могут использоваться схемы раздельного применения, такие как описанные в данном документе. Используемый в данном документе термин «разделенная доза» означает разделение «единичной стандартной дозы» или общей суточной дозы на две или более доз, например, два или более введений «единичной стандартной дозы». Как используется в настоящем документе, «единичная стандартная доза» - это доза любого терапевтического средства, вводимая в одной дозе/в одно время/одним путем/одной точкой контакта, т.е. однократное введение. Желаемая доза лиганда по настоящему изобретению может быть введена в виде «прерывистой дозы» или «непрерывным потоком». Как используется в данном документе, « прерывистая доза» - это серия единичных стандартных доз любого терапевтического средства, вводимых с установленной частотой в течение определенного периода времени. Как используется в настоящем документе, «непрерывный поток» - это доза терапевтического средства, вводимая непрерывно в течение определенного периода времени одним путем/в одной точке контакта, т.е. непрерывного введения. Общая суточная доза - количество, введенное или предписанное за 24-часовой период, - может быть назначена

любым из этих способов, или их комбинацией, или любыми другими способами, подходящими для фармацевтического введения.

Введение

[0438] В некоторых вариантах осуществления композиции для иммунотерапии могут быть введены в клетки ex vivo и впоследствии введены субъекту.

[0439] В некоторых вариантах осуществления, в зависимости от природы клеток, клетки могут быть введены в организм-хозяин, например. млекопитающему, различными способами, включая инъекцию, переливание, инфузию, местное введение или имплантацию. В некоторых аспектах клетки, описанные в настоящем документе, могут быть введены в место расположения опухоли. Количество используемых клеток будет зависеть от ряда обстоятельств, цели введения, срока жизни клеток, используемого протокола, например, количества введений, способности клеток к размножению или тому подобного. Клетки могут находиться в физиологически приемлемой среде.

[0440] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в настоящем документе, могут вводить в нескольких дозах субъектам, страдающим заболеванием или состоянием. Препараты обычно улучшают один или более симптомов рака или клинического состояния и/или лечат или предотвращают рак, клиническое состояние или его симптом.

[0441] В некоторых вариантах осуществления композиции для иммунотерапии могут вводить in vivo. В некоторых вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению, включающие биоциклы CA2, эффекторные молекулы CA2, SRE, представляющие интерес полезные нагрузки (иммунотерапевтические агенты) и композиции по изобретению могут быть доставлены in vivo субъекту. Доставка иммунотерапевтических агентов in vivo хорошо описана в данной области. Например, методы доставки цитокинов описаны в европейском патенте № EP 0930892 A1, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Способы доставки

[0442] Фармацевтические композиции, биоциклы CA2, компоненты биоциклов CA2, эффекторные модули CA2, включая их SRE (например, ДД CA2), полезные нагрузки (например, иммунотерапевтические агенты), векторы и клетки по настоящему изобретению могут быть введены любым способом для достижения терапевтически эффективного результата.

[0443] Фармацевтические композиции, биоциклы CA2, компоненты биоциклов CA2, эффекторные модули CA2, включая их SRE, или полезные нагрузки по настоящему изобретению могут вводиться любым способом для достижения терапевтически эффективного результата. К ним относятся, в частности, энтеральный (в кишечник), гастроэнтеральный, эпидуральный (в твердую мозговую оболочку), оральный (через рот), трансдермальный, перидуральный, интрацеребральный (в головной мозг), интрацеребровентрикулярный (в желудочки головного мозга), эпикутанный (нанесение на кожу), интрадермальный (в саму кожу), подкожный (под кожу), назальное введение (через нос), внутривенный (в вену), внутривенный болюс, внутривенный через капельницу, внутриартериальный (в артерию), внутримышечный (в мышцу), внутрисердечный (в сердце), внутрикостная инфузия (в костный мозг), интратекальный (в спинномозговой канал), внутрибрюшинный (инфузия или инъекция в брюшину), интравезикальная инфузия, интравитреальный (через глаз), интракавернозная инъекция (в патологическую

полость), внутриполостной (в основание полового члена), интравагинальное введение, внутриматочный, экстраамниотическое введение, трансдермальный (диффузия через неповрежденную кожу для системного распределения), трансмукозальный (диффузия через слизистую оболочку), трансвагинальный, инсуффляция (вдувание), сублингвальный, сублабиальный, клизма, глазные капли (на конъюнктиву), в ушных каплях, ушной (в ухо или через ухо), буккальный (направленный за щеку), конъюнктивальный, кожный, дентальный (в зуб или зубы), электроосмос, эндоцервикальный, эндосинусиальный, эндотрахеальный, экстракорпоральный, гемодиализ, инфильтрация, интерстициальный, внутрибрюшный, интраамниотический, внутрисуставной, интрабилиарный, интрабронхиальный, интрабурсальный, внутрихрящевой (внутрь хряща), интракаудальный (в пределах конского хвоста), интрацистернальный (в пределах цистерны мозжечка), интракорнеальный (внутрь роговицы), дентальный внутрикоронарный, интракоронарный (в коронарные артерии), интракорпоральный кавернозный (в расширяющиеся пространства corporus cavernosa полового члена), интрадискальный (в пределах диска), интрадуктальный (в протоку железы), интрадуоденальный (в пределах двенадцатиперстной кишки), интрадуральный (внутрь или под твердой мозговой оболочкой), внутриэпидермальный (в эпидермис), внутрипищеводный (в пищевод), интрагастральный (в желудок), интрагингивальный (в десна), интраилеальный (в дистальный отдел тонкой кишки), интралезиональный (внутрь или вводится непосредственно в локализованное поражение), интралюминальный (в просвет трубки), интралимфатический (в лимфу), интрамедуллярный (в полость костного мозга кости), интраменингеальный (внутрь менингита), интрамиокардиальный (внутрь миокарда), внутриглазной (внутрь глаза), интраовариальный (в яичник), интраперикардиальный (в пределах перикарда), внутриплевральный (в пределах плевры), интрапростатический (в предстательную железу), внутрилегочный (в легкие или их бронхи), интраназальный (в носовые или околоносовые пазухи), интраспинальный (в пределах позвоночного столба), интрасиновиальный (в синовиальную полость сустава), интратендинозный (в сухожилие), интратестикулярный (внутрь яичка), интратекальный (в спинномозговую жидкость на любом уровне спинномозговой оси), внутригрудной (в пределах грудной клетки), интратубулярный (в канальцы органа), внутриопухолевый (внутрь опухоли), интратимпанальный (в пределах среднего уха), внутрисосудистый (в пределах сосуда или сосудов), внутрижелудочковый (внутрь желудочка), ионтофорез (с помощью электрического тока, при котором ионы растворимых солей мигрируют в ткани организма), ирригация (орошение или промывание открытые раны или полости тела), гортань (непосредственно в гортань), назогастральный (через нос и в желудок), техника наложения окклюзионных повязок (местное введение препарата, который затем покрывается повязкой, окклюзирующей участок), офтальмологический (к наружной части глаза), орофарингеальный (непосредственно в рот и глотку), парентеральный, перкутанный, периартикулярный, перидуральный, периневральный, периодонтальный, ректальный, респираторный (в дыхательные пути путем вдыхания перорально или назально для местного или системного воздействия), ретробульбарный (за мост или за глазное яблоко), интрамиокардиальный (поступает в миокард), в мягкую ткань, субарахноидальный, субконъюнктивальный, подслизистый, местный, трансплацентарный (сквози или через плаценту), транстрахеальный (через стенку трахеи), транстимпанический (сквозь барабанную полость или через нее), мочеточниковый (в мочеточник), уретральный (в уретру), вагинальный, каудальный блокада, диагностический, блокада нервов, билиарнаю перфузия, кардиальная перфузия, фотоферез или спинальный, но не ограничиваются ими.

Парентеральное и инъекционное введение

[0444] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, биоциклы CA2, компоненты биоциклов CA2, эффекторные модули CA2, включая их SRE, или полезные нагрузки по настоящему изобретению могут вводиться парентерально. Жидкие лекарственные формы для перорального и парентерального введения включают, но не ограничиваются ими, фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и/или эликсиры. В дополнение к активным ингредиентам, жидкие лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, обычно применяемые в настоящем уровне техники, например, такие как вода или другие растворители, солюбилизирующие агенты и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное, масло зародышей пшеницы, оливковое, касторовое и кунжутное масло), глицерин, тетрагидрофурфуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот и сорбитана, а также их смеси. Помимо инертных разбавителей, пероральные композиции могут включать адъюванты, такие как смачивающие агенты, эмульгирующие и суспендирующие агенты, подсластители, ароматизаторы и/или отдушки. В некоторых вариантах осуществления для парентерального введения композиции смешивают с солюбилизирующими агентами, такими как CREMAPHOR®, спирты, масла, модифицированные масла, гликоли, полисорбаты, циклодекстрины, полимеры и/или их комбинации. В других вариантах осуществления в состав входят поверхностно-активные вещества, такие как гидроксипропилцеллюлоза.

[0445] Инъекционные формы, например, стерильные инъецируемые водные или масляные суспензии, могут быть приготовлены в соответствии с известным уровнем техники с использованием подходящих диспергирующих агентов, смачивающих агентов и/или суспендирующих агентов. Стерильные инъекционные формы могут представлять собой стерильные инъекционные растворы, суспензии и/или эмульсии в нетоксичных парентерально приемлемых разбавителях и/или растворителях, например, в виде раствора в 1,3-бутандиоле. Среди приемлемых носителей и растворителей, которые могут быть использованы, — вода, раствор Рингера, U.S.P. (Фармакопея США), и изотонический раствор хлорида натрия. Стерильные, нелетучие масла традиционно используются в качестве растворителя или суспендирующей среды. Для данной цели можно использовать любое нелетучее масло со слабовыраженным вкусом, включая синтетические моно- или диглицериды. Жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, могут быть использованы при приготовлении инъекционных растворов.

[0446] Инъекционные составы можно стерилизовать, например, путем фильтрации через задерживающий бактерии фильтр и/или путем включения стерилизующих агентов в форме стерильных твердых композиций, которые можно растворять или диспергировать в стерильной воде или другой стерильной инъекционной среде непосредственно перед применением.

[0447] Для того чтобы продлить действие активных ингредиентов, часто желательно замедлить их всасывание из подкожных или внутримышечных инъекций. Это может быть достигнуто за счет использования жидких суспензий кристаллического или аморфного материала с плохой растворимостью в воде. Скорость абсорбции активного ингредиента зависит от скорости растворения которая, в свою очередь, может зависеть от размера кристалла и кристаллической формы. Альтернативно, замедленное всасывание парентерально вводимой лекарственной формы осуществляют путем растворения или суспендирования лекарственного средства в масляном носителе. Инъекционные депо-формы изготавливаются путем формирования микрокапсулированных матриц препарата в биоразлагаемых полимерах, таких как

полилактид-полигликолид. В зависимости от соотношения лекарства и полимера, а также природы конкретного применяемого полимера, можно управлять скоростью высвобождения лекарства. Примеры других биологически разлагаемых полимеров включают сложные поли(ортоэфиры) и поли(ангидриды). Депо-инъекционные составы готовят путем включения лекарства в липосомы или микроэмульсии, которые совместимы с тканями организма.

Офтальмологическое или оральное введение

[0448] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, биоциклы CA2, компоненты биоциклов CA2, эффекторные модули CA2, включая их SRE, или полезные нагрузки по настоящему изобретению могут быть приготовлены, упакованы и/или проданы в формах, подходящих для офтальмологического и/или орального введения. Такие составы могут быть, например, в форме глазных и/или ушных капель, включающих, например, 0,1/1,0% (масс./масс.) раствор и/или суспензию активного ингредиента в водных и/или маслянистых жидких вспомогательных веществах. Такие капли могут дополнительно включать буферные агенты, соли и/или один или более других дополнительных ингредиентов, описанных в настоящем документе. Другие применимые офтальмологически вводимые составы включают составы, содержащие активные ингредиенты в микрокристаллической форме и/или в виде липосомальных препаратов. Субретинальные вставки также могут использоваться в качестве форм введения.

Обнаруживаемые агенты и метки

[0449] Стимулы, системы и компоненты биоциклов CA2, эффекторные модули CA2, включая SRE, и полезные нагрузки могут быть связаны с одним или более радиоактивными агентами или детектируемыми агентами.

[0450] Эти агенты включают различные органические малые молекулы, неорганические соединения, наночастицы, ферменты или субстраты ферментов, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы (например, люминол), биолюминесцентные материалы (например, люцифераза, люциферин и экворин), хемилюминесцентные материалы, радиоактивные материалы (например, ^{18}F, ^{67}Ga, ^{81m}Kr, ^{82}Rb, ^{111}In, ^{123}I, ^{133}Xe, ^{201}Tl, ^{125}I, ^{35}S, ^{14}C, ^{3}H или ^{99m}Tc (например, как пертехнетат (технетат(VII), TcO_4^-)) и контрастные вещества (например, золото (например, наночастицы золота), гадолиний (например, хелатированное Gd), оксиды железа (например, суперпарамагнитный оксид железа (SPIO), монокристаллические наночастицы оксида железа (MION) и сверхмалый суперпарамагнитный оксид железа (USPIO)), хелаты марганца (например, Mn-DPDP), сульфат бария, йодированные контрастные вещества (иогексол), микропузырьки или перфторуглероды).

[0451] В некоторых вариантах осуществления детектируемый агент может быть необнаруживаемым предшественником, который становится детектируемым при активации (например, флуорогенные тетразин-флуорофорные конструкции (например, тетразин-BODIPY FL, тетразин-Oregon Green 488 или тетразин-BODIPY TMR-X) или активируемые ферментом флуорогенные агенты (например, PROSENSE® (VisEn Medical))). Анализы in vitro, в которых могут быть использованы меченные ферментами композиции, включают иммуносорбентные анализы, связанные с ферментами (ИФА), иммунопреципитационные анализы, иммунофлуоресценцию, ферментный иммуноанализ (ФИА), радиоиммуноанализ (РИА) и вестерн-блоттинг, но не ограничиваются ими.

Наборы

[0452] Настоящее изобретение включает различные наборы для удобного и/или эффективного осуществления способов по настоящему изобретению. Как правило, наборы включают достаточное количество и/или число компонентов, чтобы пользователь мог провести одну или более процедур с субъектом(ами) и/или выполнить один или более экспериментов.

[0453] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложены наборы для ингибирования генов in vitro или in vivo, включающие биоцикл CA2 по настоящему изобретению или комбинацию биоциклов CA2 по настоящему изобретении, необязательно в комбинации с любыми другими подходящими активными агентами.

[0454] Набор может дополнительно включать упаковку и инструкции и/или средство доставки для формирования рецептурной композиции. Агент доставки может содержать, например, физраствор, буферный раствор.

[0455] В дополнительных вариантах осуществления предложены наборы для скрининга анализов. В набор входит контейнер для скринингового анализа. Инструкция по использованию анализа и информация о методе скрининга должны быть включены в набор.

IV. ПРИМЕНЕНИЯ

[0456] Биоциклы CA2, эффекторные модули CA2, SRE, стимулы, композиции или системы, содержащие один или более стимулов, биоциклы CA2, эффекторные модули CA2 по настоящему изобретению, могут быть использованы в большом разнообразии применений, включая терапию, диагностику и прогнозирование, биоинжениринг, биотехнологию, биофабрики, исследовательские агенты, метаболомику, экспрессию генов, замену ферментов и т. д., но не ограничиваясь ими.

Применение в терапевтических целях

Иммунотерапия рака

[0457] Иммунотерапия рака направлена на индукцию или восстановление реакционной способности иммунной системы на рак. Значительные успехи в исследованиях иммунотерапии привели к разработке различных стратегий, которые в широком смысле можно разделить на активную иммунотерапию и пассивную иммунотерапию. В целом, эти стратегии могут быть использованы для прямого уничтожения раковых клеток или для противодействия иммуносупрессивному микроокружению опухоли. Активная иммунотерапия направлена на индукцию эндогенного, длительного иммунного ответа, специфичного для опухолевого антигена. Ответ может быть дополнительно усилен неспецифической стимуляцией модификаторами иммунного ответа, такими как цитокины. В отличие от этого, пассивная иммунотерапия включает подходы, при которых хозяину вводят эффекторные иммунные молекулы, такие как цитотоксические Т-клетки или антитела, специфичные к опухолевому антигену. Этот подход непродолжителен и требует многократного применения.

[0458] Несмотря на значительные успехи, эффективность современных стратегий иммунотерапии ограничена сопутствующей токсичностью. Они часто связаны с узким терапевтическим окном, связанным с иммунотерапией, что отчасти является следствием необходимости доведения терапевтической дозы до грани потенциально смертельной токсичности, чтобы получить клинически значимый эффект лечения. Кроме того,

доза расширяется *in vivo*, поскольку адоптивно перенесенные иммунные клетки продолжают пролиферировать в организме пациента, часто непредсказуемо.

[0459] Основной риск, связанный с иммунотерапией, - это побочные эффекты, возникающие в результате активации Т-клеток в ответ на экспрессию опухоль-ассоциированного антигена (ТАА) в нормальной ткани. В клинических испытаниях с использованием Т-клеток, экспрессирующих Т-клеточный рецептор против специфических ТАА, сообщалось о кожной сыпи, колите и потере слуха в ответ на иммунотерапию.

[0460] Иммунотерапия может также вызывать целевые, внутриопухолевые токсические эффекты, возникающие при уничтожении опухолевых клеток в ответ на иммунотерапию. Нежелательные явления включают синдром лизиса опухоли, синдром высвобождения цитокинов и связанный с ним синдром активации макрофагов. Важно отметить, что эти нежелательные эффекты могут возникать во время разрушения опухолей, и поэтому даже успешная внутриопухолевая иммунотерапия может привести к токсичности. Таким образом, подходы к регулированию иммунотерапии являются весьма желательными, поскольку они способны снизить токсичность и максимально увеличить эффективность.

[0461] В настоящем изобретении предложены системы, композиции, иммунотерапевтические агенты и способы иммунотерапии рака. Эти композиции обеспечивают настраиваемую регуляцию экспрессии и функции генов в иммунотерапии. В настоящем изобретении также предложены биоциклы CA2, эффекторные модули CA2, элементы ответа на стимул (SRE) и полезные нагрузки, а также полинуклеотиды, кодирующие любое из вышеперечисленного. В одном аспекте, системы, композиции, иммунотерапевтические агенты и другие компоненты по изобретению могут управляться отдельно добавляемым стимулом, что обеспечивает значительную гибкость для регулирования иммунотерапии рака. Кроме того, системы, композиции и способы по настоящему изобретению также могут быть объединены с терапевтическими агентами, такими как химиотерапевтические агенты, низкомолекулярные соединения, генная терапия и антитела.

[0462] Настраиваемые свойства систем и композиций по изобретению имеет потенциал для улучшения активности и продолжительности эффективности иммунотерапии. Обратимое подавление биологической активности адоптивно перенесенных клеток с помощью композиций по настоящему изобретению позволяет максимально использовать потенциал клеточной терапии без необратимого уничтожения и прекращения терапии.

[0463] В настоящем изобретении предложены способы тонкой настройки иммунотерапии после введения пациентам. Это, в свою очередь, повышает безопасность и эффективность иммунотерапии и увеличивает популяцию пациентов, которые могут получить пользу от иммунотерапии.

[0464] В одном из вариантов осуществления биоциклы CA2, эффекторные модули CA2, SRE и компоненты, регулирующие уровень экспрессии и активность любых агентов, могут быть использованы для иммунотерапии. В качестве неограничивающих примеров иммунотерапевтический агент может представлять собой антитело и его фрагменты и варианты, раково-специфический Т-клеточный рецептор (ТКР) и его варианты, противоопухолевый специфический химерный антигенный рецептор (CAR), химерный переключающий рецептор, ингибитор коингибиторного рецептора или лиганда, агонист костимулирующего рецептора и лиганда, цитокин, хемокин, рецептор цитокина, рецептор хемокина, растворимый фактор роста, метаболический фактор,суицидальный ген, хоуминг-рецептор или любой агент, вызывающий иммунный ответ в клетке и субъекте.

[0465] В некоторых вариантах осуществления композиция для индуцирования иммунного ответа может включать эффекторный модуль CA2. В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль CA2 может включать в себя элемент ответа на стимул (SRE), функционально связанный с по меньшей мере одной полезной нагрузкой. В одном аспекте полезная нагрузка может быть иммунотерапевтическим агентом.

[0466] В некоторых вариантах осуществления биоциклы CA2, эффекторные модули CA2 и композиции по настоящему изобретению относятся к посттрансляционной регуляции функции белка (полезной нагрузки) противоопухолевых иммунных ответов иммунотерапевтических агентов.

1. Адоптивный перенос клеток (адоптивная иммунотерапия)

[0467] В некоторых вариантах осуществления клетки, генетически модифицированные для экспрессии по меньшей мере одного биоцикла CA2, эффекторного модуля CA2, SRE (например, ДД CA2) и/или представляющей интерес полезной нагрузки (иммунотерапевтического агента), могут быть использованы для адоптивной клеточной терапии (АКТ). Как используется в настоящем документе, адоптивный перенос клеток относится к введению иммунных клеток (от аутологичных, аллогенных или генетически модифицированных хозяев) с направленной противораковой активностью. АКТ показала перспективность клинического применения против злокачественных и инфекционных заболеваний. Например, Т-клетки, генетически модифицированные для распознавания CD19, использовались для лечения фолликулярной В-клеточной лимфомы (Kochenderfer et al., *Blood*, 2010, 116:4099-4102 и Kochenderfer and Rosenberg, *Nat Rev Clin Oncol.,* 2013, 10(5): 267-276), а АКТ с использованием аутологичных лимфоцитов, генетически модифицированных для экспрессии противоопухолевых Т-клеточных рецепторов, была использована для лечения метастатической меланомы (Rosenberg and Dudley, *Curr. Opin. Immunol.* 2009, 21: 233-240), но не ограничиваясь ими.

[0468] Согласно настоящему изобретению, биоциклы и системы CA2 могут быть использованы при разработке и внедрении клеточной терапии, такой как адоптивная клеточная терапия. Некоторые эффекторные модули, применимые в клеточной терапии, приведены на Фиг. 7-12 в Международной публикации № WO 2017/180587, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Биоциклы CA2, эффекторные модули CA2 и их SRE и полезные нагрузки могут быть использованы в клеточной терапии для проведения CAR-терапии, для манипуляции или регулирования TIL, в аллогенной клеточной терапии, в комбинированной Т-клеточной терапии с другими линиями лечения (например, радиация, цитокины), для кодирования сконструированных ТКР или модифицированных ТКР, или для усиления Т-клеток, отличных от ТКР (например, путем введения генов цитокинов, генов ингибиторов контрольных точек PD1, CTLA4).

[0469] В настоящем документе предложены способы для использования в адоптивной клеточной терапии. Способы включают предварительное кондиционирование субъекта, нуждающегося в этом, модуляцию иммунных клеток с помощью SRE, биоциклов CA2 и композиций по настоящему изобретению, введение субъекту сконструированных иммунных клеток, экспрессирующих композиции по изобретению, и успешное приживление сконструированных клеток у субъекта.

[0470] В некоторых вариантах осуществления SRE, биоциклы CA2 и композиции по настоящему изобретению могут быть использованы для минимизации режимов предварительного кондиционирования, связанных с адоптивной клеточной терапией. Как используется в настоящем документе, « предварительное

кондиционирование» относится к любому терапевтическому режиму, назначаемому субъекту для улучшения результатов адоптивной клеточной терапии. Стратегии предварительного кондиционирования включают облучением всего тела и/или лимфодренирующей химиотерапией, но не ограничиваются этим. Клинические испытания адоптивной терапии без предварительного кондиционирования не продемонстрировали никакой клинической пользы, что указывает на его важность в АКТ. Тем не менее, предварительное кондиционирование связано со значительной токсичностью и ограничивает когорту испытуемых, подходящих для АКТ. В некоторых случаях иммунные клетки для АКТ могут быть сконструированы таким образом, чтобы экспрессировать цитокины, такие как IL12 и IL15, в качестве полезной нагрузки с использованием SRE по настоящему изобретению, чтобы уменьшить необходимость в предварительного кондиционирования (Pengram et al. (2012) Blood 119 (18): 4133-41; содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[0471] В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки для АКТ могут представлять собой дендритные клетки, Т-клетки, такие как $CD8^+$ Т-клетки и $CD4^+$ Т-клетки, природные клетки-киллеры (NK), NK Т-клетки, цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ), инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), лимфокин-активированные клетки-киллеры (LAK), Т-клетки памяти, регуляторные Т-клетки (Treg), хелперные Т-клетки, цитокин-индуцированные клетки-киллеры (CIK), и любая их комбинация. В других вариантах осуществления иммуностимулирующие клетки для АКТ могут быть получены из эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). В некоторых вариантах осуществления для АКТ используют аутологичные или аллогенные иммунные клетки.

[0472] В некоторых вариантах осуществления клетки, используемые для АКТ, могут быть Т-клетками, сконструированными для экспрессии CAR, включающих антигенсвязывающий домен, специфичный для антигена на представляющих интерес опухолевых клетках. В других вариантах осуществления клетки, используемые для АКТ, могут быть NK-клетками, сконструированными для экспрессии CAR, включающих антигенсвязывающий домен, специфичный для антигена на представляющих интерес опухолевых клетках. Помимо адоптивного переноса генетически модифицированных Т-клеток (например, CAR Т-клеток) для иммунотерапии, для адоптивной иммунотерапии можно использовать альтернативные типы лейкоцитов, экспрессирующих CAR, либо отдельно, либо в комбинации с CAR Т-клетками. В одном примере для АКТ может использоваться смесь Т-клеток и NK-клеток. Уровень экспрессии CAR в Т-клетках и NK-клетках, согласно настоящему изобретению, регулируется и контролируется небольшой молекулой, которая связывается с ДД, функционально связанным с CAR в эффекторном модуле CA2.

[0473] В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению могут быть помещены под транскрипционный контроль константного локуса альфа Т-клеточного рецептора (TRAC) в Т-клетках для достижения равномерной экспрессии CAR при повышении активности Т-клеток. Локус TRAC может быть нарушен с помощью CRISPR/Cas 9, нуклеаз с цинковыми пальцами (ZFN), TALEN с последующей вставкой конструкции CAR. Способы конструирования конструкций CAR, направленных на локус TRAC, описаны в Eyquem J. et al (2017) Nature.543(7643):113-117 (содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме).

[0474] В некоторых вариантах осуществления NK-клетки, сконструированные для экспрессии настоящих композиций, могут быть использованы для АКТ. Активация NK-клеток индуцирует перфорин/гранзим-зависимый апоптоз в клетках-мишенях. Активация NK-клеток также вызывает секрецию

цитокинов, таких как ИФН γ, TNF-α и GM-CSF. Эти цитокины усиливают фагоцитарную функцию макрофагов и их антимикробную активность, а также усиливают адаптивный иммунный ответ через повышение регуляции презентации антигена антигенпредставляющими клетками, такими как дендритные клетки (ДК) (рассмотрено в Vivier et al., *Nat. Immunol*., 2008, 9(5): 503-510), но не ограничиваясь ими.

[0475] Другие примеры генетической модификации могут включать введение химерных антигенных рецепторов (CAR) и снижение регуляции ингибирующих рецепторов NK-клеток, таких как NKG2A.

[0476] NK-клетки также могут быть генетически перепрограммированы, чтобы обойти ингибирующие сигналы NK-клеток при взаимодействии с опухолевыми клетками. Например, использование CRISPR, ZFN или TALEN для генетической модификации NK-клеток, чтобы подавить их ингибирующие рецепторы, может повысить противоопухолевую способность NK-клеток.

[0477] Иммунные клетки могут быть выделены и размножены *ex vivo* с помощью различных методов, известных в данной области. Например, методы выделения и размножения цитотоксических Т-клеток описаны в патентах США № 6805861 и 6531451; патентной публикации США №. US 20160348072A1 и международной патентной публикации № WO 2016168595A1; содержание каждого из которых включено в настоящий документ путем ссылки во всей своей полноте. Выделение и размножение NK-клеток описаны в патентной публикации США № US 20150152387A1, патенте США № 7435596 и Oyer, J.L. (2016). Cytotherapy.18(5):653-63; содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. В частности, первичные NK-клетки человека могут быть размножены в присутствии питающих клеток, например, линии миелоидных клеток, генетически модифицированной для экспрессии мембраносвязанных IL15, IL21, IL12 и 4-1BBL.

[0478] В некоторых случаях субпопуляции иммунных клеток могут быть обогащены для АКТ. Способы обогащения иммунных клеток описаны в международной патентной публикации № WO 2015039100A1. В другом примере Т-клетки, положительные по маркеру аттенюатора В- и Т-лимфоцитов (BTLA), могут быть использованы для обогащения Т-лимфоцитами, которые обладают противораковой реактивностью, как описано в патенте США №9512401 (содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[0479] В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки для АКТ могут быть истощены в отношении выбранных субпопуляциях для увеличения размножения Т-клеток. Например, иммунные клетки могут быть истощены в отношении Foxp3+ Т-лимфоцитов для уменьшения противоопухолевого иммунного ответа с помощью методов, описанных в патентной публикации США № US 20160298081A1; содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0480] В некоторых вариантах осуществления активация и размножения Т-клеток для АКТ достигается антигенной стимуляцией временно экспрессируемого рецептора химерного антигена (CAR) на поверхности клетки. Такие методы активации описаны в международном патенте № WO 2017015427, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0481] В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки могут быть активированы антигенами, связанными с антигенпрезентирующими клетками (АПК). В некоторых вариантах осуществления АПК могут быть дендритными клетками, макрофагами или В-клетками, антигенспецифическими или неспецифическими. АПК могут быть аутологичными или гомологичными в своем органе. В некоторых вариантах осуществления

АПК могут быть искусственными антигенпрезентирующими клетками (иАПК), такими как иАПК на основе клеток или ацеллюлярные иАПК. Клетки на основе иАПК могут быть выбраны из генетически модифицированных аллогенных клеток, таких как клетки эритролейкемии человека, или ксеногенных клеток, таких как мышиные фибробласты и клетки дрозофилы. В качестве альтернативы, АПК могут быть ацеллюлярными, в которых антигены или костимулирующие домены представлены на синтетических поверхностях, таких как латексные шарики, полистироловые шарики, липидные везикулы или экзосомы.

[0482] В некоторых вариантах осуществления клетки по изобретению, в частности Т-клетки, могут быть размножены с помощью искусственных клеточных платформ. В одном варианте осуществления зрелые Т-клетки могут быть получены с помощью искусственных тимических органоидов (ИТО, англ.: artificial thymic organoids), описанных в Seet CS et al. 2017. *Nat Methods*. 14, 521–530 (содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте). ИТО основаны на линии стромальных клеток, экспрессирующих дельта-подобный канонический notch-лиганд (DLL1). В этом способе стромальные клетки объединяют с гемопоэтическими стволовыми клетками и клетками-предшественниками путем центрифугирования и размещают на вставке с культурой клеток на границе раздела воздух-жидкость для создания культур органоидов. Т-клетки, полученные из ИТО, демонстрируют наивные фенотипы, разнообразный репертуар Т-клеточных рецепторов (ТКР) и ТКР-зависимую функцию.

[0483] В некоторых вариантах осуществления адоптивная клеточная терапия проводится путем аутологичного переноса, при котором клетки получают от субъекта, нуждающегося в лечении, и после выделения и обработки клетки вводят тому же субъекту. В других случаях АКТ может включать аллогенный перенос, при котором клетки выделяют и/или готовят от субъекта-донора, отличного от субъекта-реципиента, который в конечном итоге получает клеточную терапию. Донор и реципиент могут быть генетически идентичными, или похожими, или могут экспрессировать один и тот же класс или подтип HLA.

[0484] В некоторых вариантах осуществления множество иммунотерапевтических агентов, введенных в иммунные клетки для АКТ (например, Т-клетки и NK-клетки), могут контролироваться одним и тем же биоциклом CA2. В других вариантах осуществления множество иммунотерапевтических агентов, введенных в иммунные клетки для АКТ (например, Т-клетки и NK-клетки), могут контролироваться разными биоциклами CA2. В другом примере суицидальный ген и конструкция CAR могут быть связаны с двумя отдельными эффекторными модулями CA2.

[0485] После генетического модулирования с использованием SRE, биоциклов CA2 и композиций по изобретению, клетки вводят субъекту, нуждающемуся в этом. Способы введения клеток для адоптивной клеточной терапии известны и могут быть использованы в связи с предложенными способами и композициями. Например, способы адоптивной Т-клеточной терапии описаны, например, в публикации заявки на патент США № 2003/0170238 для Gruenberg et al; патенте США № 4690915 для Rosenberg; Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8(10):577-85). См., например, Themeli et al. (2013) Nat Biotechnol. 31(10): 928-933; Tsukahara et al. (2013) Biochem Biophys Res Commun 438(1): 84-9; Davila et al. (2013) PLoS ONE 8(4): e61338; содержание каждого из которых включено в настоящий документ путем ссылки во всей своей полноте.

[0486] В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки для АКТ могут быть модифицированы для экспрессии одного или более иммунотерапевтических агентов, которые способствуют активации, инфильтрации, размножению, выживанию и противоопухолевым функциям иммунных клеток.

Иммунотерапевтические агенты могут быть вторым CAR или ТКР, специфичными к другой целевой молекуле; цитокином или рецептором цитокина; химерным переключающим рецептором, который преобразует ингибирующий сигнал в стимулирующий; хоуминг-рецептором, который направляет адоптивно перенесенные клетки к целевому участку, например, к опухолевой ткани; агентом, оптимизирующим метаболизм иммунной клетки; или геномом предохранительного выключателя (например, суицидальный ген), который уничтожает активированные Т-клетки, когда после адоптивного переноса клеток наблюдается тяжелое нежелательное явление или когда перенесенные иммунные клетки больше не нужны.

[0487] В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки, используемые для адоптивного переноса клеток, могут быть подвержены генетическим манипуляциям для улучшения их персистенции, цитотоксичности, способности нацеливаться на опухоль и способности приживаться в очагах заболевания *in vivo*, с общей целью дальнейшего улучшения их способности уничтожать опухоли у пациентов с раком. Одним из примеров является введение эффекторных модулей CA2 по изобретению, включающих цитокины, такие как гамма-цитокины (IL2 и IL15), в иммунные клетки для содействия пролиферации и выживанию иммунных клеток. Трансдукция генов цитокинов (например, гамма-цитокинов IL2 и IL15) в клетки позволит размножать иммунные клетки без добавления экзогенных цитокинов, а экспрессирующие цитокины NK-клетки обладают повышенной опухолевой цитотоксичностью.

[0488] В некоторых вариантах осуществления биоциклы CA2, SRE или эффекторные модули CA2 могут быть использованы для предотвращения истощения Т-клеток. Как используется в настоящем документе, «истощение Т-клеток» относится к поэтапной и прогрессирующей потере функции Т-клеток, вызванной хронической активацией Т-клеток. Истощение Т-клеток является основным фактором, ограничивающим эффективность противовирусной и противоопухолевой иммунотерапии. Истощенные Т-клетки имеют низкую пролиферативную и цитокинопродуцирующую способность, одновременно с высокой скоростью апоптоза и высокой поверхностной экспрессией многочисленных ингибирующих рецепторов. Активация Т-клеток, приводящая к истощению, может происходить как в присутствии, так и в отсутствии антигена.

[0489] В некоторых вариантах осуществления биоциклы CA2 и их компоненты могут быть использованы для предотвращения истощения Т-клеток в контексте терапии химерными антигенными рецепторами Т-клеток (CAR-T). В этом контексте истощение в некоторых случаях может быть вызвано олигомеризацией scFvs CAR на поверхности клетки, что приводит к непрерывной активации внутриклеточных доменов CAR. В качестве неограничивающего примера, CAR по настоящему изобретению могут включать scFvs, которые не способны к олигомеризации. В качестве еще одного неограничивающего примера, CAR, которые быстро интернализуются и повторно экспрессируются после воздействия антигена, также могут быть выбраны для предотвращения хронической олигомеризации scFv на поверхности клеток. В одном из вариантов осуществления каркасная область scFvs может быть модифицирована для предотвращения конститутивной передачи сигнала CAR (Long et al. 2014. Cancer Research. 74(19) S1; содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки). Настраиваемые биоциклы CA2 по настоящему изобретению могут также использоваться для регулирования экспрессии CAR на поверхности Т-клеток для предотвращения хронической активации Т-клеток. CAR по изобретению также могут быть сконструированы таким образом, чтобы минимизировать истощение. В качестве неограничивающего примера, сигнальный домен 41-BB может быть включен в конструкцию CAR для улучшения истощения Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, любая из стратегий, описанных в Long H A et al. может быть использована для

предотвращения истощения (Long A H et al. (2015) Nature Medicine 21, 581–590; содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки).

[0490] В некоторых вариантах осуществления настраиваемое свойство биоциклов CA2 по настоящему изобретению может быть использовано для обратимого истощения Т-клеток человека, наблюдаемого при тонической передачей сигнала CAR. Обратимое подавление биологической активности адоптивно перенесенных клеток с помощью композиций по настоящему изобретению может быть использовано для обратимой тонической передачи сигнала, что, в свою очередь, может активировать Т-клетки. Обратимость истощения может быть измерена по снижению уровня множественных ингибирующих рецепторов, связанных с истощением.

[0491] В некоторых вариантах осуществления метаболические пути Т-клеток могут быть изменены для уменьшения восприимчивости Т-клеток к истощению. Метаболические пути могут включать гликолиз, цикл мочевины, цикл лимонной кислоты, бета-окисление, биосинтез жирных кислот, пентозофосфатный путь, биосинтез нуклеотидов и метаболический путь гликогена, но не ограничиваются ими. В качестве неограничивающего примера, полезные нагрузки, снижающие скорость гликолиза, могут быть использованы для ограничения или предотвращения истощения Т-клеток (Long et al. Journal for Immunotherapy of Cancer 2013, 1(Suppl 1): P21; содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки). В одном варианте осуществления Т-клетки по настоящему изобретению могут использоваться в комбинации с ингибиторами гликолиза, такими как 2-дезоксиглюкоза и рапамицином.

[0492] В некоторых вариантах осуществления полезные нагрузки по изобретению могут быть использованы в сочетании с антителами или фрагментами, которые нацелены на поверхностные маркеры Т-клеток, связанные с истощением Т-клеток. Маркеры поверхности Т-клеток, связанные с истощением Т-клеток, которые могут быть использованы, включают CTLA-1, PD-1, TGIT, LAG-3, 2B4, BTLA, TIM3, VISTA и CD96, но не ограничиваются ими.

[0493] В одном варианте осуществления полезная нагрузка по изобретению может представлять собой CAR CD276 (с внутриклеточными доменами CD28, 4-IBB и CD3 зета), который не показывает повышения уровня маркеров, связанных с ранним истощением Т-клеток (см. международную патентную публикацию № WO 2017044699; содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме).

[0494] В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению могут быть использованы для изменения популяций TIL (инфильтрирующих опухоль лимфоцитов) у субъекта. В одном варианте осуществления изобретения любая из полезных нагрузок, описанных в настоящем документе, может быть использована для изменения соотношения CD4-положительных клеток и CD8-положительных популяций. В некоторых вариантах осуществления, TIL могут быть отсортированы ex vivo и сконструированы для экспрессии любого из цитокинов, описанных в настоящем документе. Полезные нагрузки по изобретению могут быть использованы для размножения CD4 и/или CD8 популяций TIL для усиления TIL-опосредованного иммунного ответа.

2. Противораковые вакцины

[0495] В некоторых вариантах осуществления биоциклы CA2, эффекторные модули CA2, представляющие интерес полезные нагрузки (например, иммунотерапевтические агенты), векторы, клетки и

композиции по настоящему изобретению могут быть использованы в сочетании с противораковыми вакцинами.

[0496] В некоторых вариантах осуществления противораковая вакцина может включать пептиды и/или белки, полученные из опухолеассоциированного антигена (TAA). Такие стратегии могут быть использованы для того, чтобы вызвать иммунный ответ у субъекта, который в некоторых случаях может быть ответом цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ). Пептиды, используемые для противораковых вакцин, также могут быть модифицированы в соответствии с профилем мутаций субъекта. Например, пептиды, полученные из EGFR, с мутациями, соответствующими мутациям, обнаруженным у субъекта, нуждающегося в терапии, были успешно использованы у пациентов с раком легких (Li F et al. (2016) Oncoimmunology. Oct 7;5(12): e1238539; содержание которого полностью включено в настоящий документ путем ссылки).

[0497] В одном варианте осуществления противораковые вакцины по настоящему изобретению могут быть суперагонистическими измененными пептидными лигандами (APL), полученными из TAA. Это мутантные пептидные лиганды, отклоняющиеся от нативной пептидной последовательности на одну или более аминокислот, которые активируют специфические клоны ЦТЛ более эффективно, чем нативные эпитопы. Эти изменения могут позволить пептиду лучше связываться с ограничивающей молекулой MHC класса I или более благоприятно взаимодействовать с ТКР данного подмножества опухолеспецифических ЦТЛ. APL могут быть выбраны с помощью методов, описанных в патентной публикации США № US 20160317633 A1, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

3. Комбинированное лечение

[0498] В некоторых вариантах осуществления желательно комбинировать композиции, векторы и клетки по изобретению для введения субъекту. Композиции по изобретению, включающие различные иммунотерапевтические агенты, могут быть использованы в комбинации для усиления иммунотерапии.

[0499] В некоторых вариантах осуществления желательно сочетать композиции по изобретению с адъювантами, которые могут повысить активность и продолжительность антигенспецифических иммунных ответов. Адъюванты, используемые в качестве иммуностимуляторов в комбинированной терапии, включают биологические молекулы или носители, доставляющие антигены. В качестве неограничивающих примеров, композиции по изобретению могут быть объединены с биологическими адъювантами, такими как цитокины, Toll-подобные рецепторы, бактериальные токсины и/или сапонины. В других вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению могут быть объединены с носителями для доставки. Примерные носители включают полимерные микросферы, иммуностимулирующие комплексы, эмульсии (масло-в-воде или вода-в-масле), соли алюминия, липосомы или виросомы.

[0500] В некоторых вариантах осуществления эффекторные иммунные клетки, модифицированные для экспрессии биоциклов CA2, эффекторных модулей CA2, SRE (например, ДД) и полезной нагрузки по изобретению, могут быть объединены с биологическими адъювантами, описанными в настоящем документе. Двойная регуляция CAR и цитокинов и лигандов для разделения кинетического контроля мишень-опосредованной активации и внутреннего размножения Т-клеток. Такая двойная регуляция также сводит к минимуму необходимость в схемах предварительного кондиционирования пациентов. В качестве неограничивающего примера, ДД-регулируемый CAR, например, CAR CD19 можно комбинировать с

цитокинами, например, IL12 для повышения противоопухолевой эффективности CAR (Pegram H.J., et al. Tumor-targeted T cells modified to secrete IL12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. Blood.2012;119:4133–41; содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте). В качестве еще одного не ограничивающего примера, Merchant et al. описывают комбинированные вакцинации на основе дендритных клеток с рекомбинантным IL7 человека для улучшения исхода у пациентов-детей с саркомами высокого риска (Merchant, M.S. et. al. Adjuvant immunotherapy to Improve Outcome in High-Risk Pediatric Sarcomas. Clin Cancer Res. 2016. 22(13):3182-91; содержание каждого из которых включено в настоящий документ путем ссылки во всей своей полноте).

[0501] В некоторых вариантах осуществления эффекторные иммунные клетки, модифицированные для экспрессии одного или более антигенспецифических ТКР или CAR, могут быть объединены с композициями по изобретению, включающими иммунотерапевтические агенты, которые преобразуют иммуносупрессивное микроокружение опухоли.

[0502] В одном аспекте эффекторные иммунные клетки, модифицированные для экспрессии CAR, специфичных для различных молекул-мишеней на одной и той же клетке, могут быть объединены. В другом аспекте различные иммунные клетки, модифицированные для экспрессии одной и той же конструкции CAR, такие как NK-клетки и Т-клетки, могут быть использованы в комбинации для лечения опухоли, например, Т-клетки, модифицированные для экспрессии CAR CD19, могут быть объединены с NK-клетками, модифицированными для экспрессии того же CAR CD19, для лечения В-клеточной злокачественной опухоли.

[0503] В других вариантах осуществления иммунные клетки, модифицированные для экспрессии CAR, могут быть объединены с агентами блокады контрольных точек.

[0504] В некоторых вариантах осуществления эффекторные иммунные клетки, модифицированные для экспрессии биоциклов CA2, эффекторных модулей CA2, SRE (например, ДД CA2) и полезной нагрузки по изобретению, могут быть объединены с противораковыми вакцинами по изобретению.

[0505] В некоторых вариантах осуществления способы по изобретению могут включать комбинацию композиций по изобретению с другими агентами, эффективными при лечении рака, инфекционных заболеваний и других иммунодефицитных расстройств, такими как противораковые агенты. Как используется в данном документе, термин «противораковый агент» относится к любому агенту, который способен негативно влиять на рак у субъекта, например, уничтожая раковые клетки, вызывая апоптоз в раковых клетках, снижая скорость роста раковых клеток, снижая частоту или количество метастазов, уменьшая размер опухоли, ингибируя рост опухоли, снижая кровоснабжение опухоли или раковых клеток, стимулируя иммунный ответ против раковых клеток или опухоли, предотвращая или ингибируя прогрессирование рака, или увеличивая продолжительность жизни субъекта с раком.

[0506] В некоторых вариантах осуществления противораковый агент или терапия может представлять собой химиотерапевтический агент, или радиотерапию, иммунотерапевтический агент, хирургию или любой другой терапевтический агент, который в сочетании с настоящим изобретением повышает терапевтическую эффективность лечения.

[0507] В одном варианте осуществления эффекторный модуль CA2, включающий CAR CD19, может быть использован в комбинации с производными аминопиримидина, такими как ингибитор рецепторной тирозинкиназы Буркита (BTK), с использованием методов, описанных в международной патентной заявке №

WO 2016164580, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0508] В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению могут использоваться в комбинации с иммунотерапевтическими препаратами, отличными от описанной в данном документе инновационной терапии, такими как антитела, специфичные к некоторым целевым молекулам на поверхности опухолевой клетки.

[0509] Примерные химиотерапевтические препараты включают, помимо прочего, ацивицин; акларубицин; акодазола гидрохлорид; акронин; адозелесин; альдеслейкин; альтретамин; амбомицин; аметантрона ацетат; амсакрин; анастрозол; антрамицин; аспарагиназа; асперрин, сулиндак, куркумин, алкилирующие агенты, включая: Азотистые иприты, такие как мехлорэтамин, циклофосфамид, ифосфамид, мелфалан и хлорамбуцил; нитрозомочевины, такие как кармустин (BC U), ломустин (CCNU) и семустин (метил-CC U); тиленимины/метилмеламин, такие как триэтиленмеламин (TEM), триэтилен, тиофосфорамид (тиотепа), гексаметилмеламин (HMM, алтретамин); алкилсульфонаты, такие как бусульфан; триазины, такие как дакарбазин (DTIC); антиметаболиты, включая аналоги фолиевой кислоты, такие как метотрексат и триметрексат, пирролидиновые аналоги, такие как 5-фторурацил, фтордезоксиуридин, гемцитабин, арабинозид цитозина (AraC, цитарабин), 5-азацитидин, 2,2'-дифтордезоксицитидин, пуриновые аналоги, такие как 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, азатиоприн, 2'-дезоксикоформицин (пентостатин), эритрогидроксиниладенин (EHNA), флударабина фосфат и 2-хлородезоксиаденозин (кладрибин, 2-CdA); натуральные продукты, включая антимитотические препараты, такие как паклитаксел, алкалоиды барвинка, включая винбластин (VLB), винкристин и винорелбин, таксотер, эстрамустин и эстрамустина фосфат; эпиподофилотоксины, такие как этопозид и тенипозид; антибиотики, такие как актимомицин D, дауномицин (рубидомицин), доксорубицин, митоксантрон, идарубицин, блеомицины, пликамицин (митрамицин), митомицинC и актиномицин; ферменты, такие как L-аспарагиназа, цитокины, такие как интерферон (ИФН)-гамма, фактор некроза опухоли (TNF)-альфа, TNF-бета и GM-CSF, антиангиогенные факторы, такие как ангиостатин и эндостатин, ингибиторы FGF или VEGF, такие как растворимые формы рецепторов для ангиогенных факторов, включая растворимые рецепторы VGF/VEGF, платиновые координационные комплексы, такие как цисплатин и карбоплатин, антрацендионы, такие как митоксантрон, замещенная мочевина, такая как гидроксимочевина, производные метилгидразина, включая N-метилгидразин (MIFf) и прокарбазин, адренокортикальные супрессанты, такие как митотан (o,ρ'-DDD) и аминоглютетимид; гормоны и антагонисты, включая антагонисты адренокортикостероидов, такие как преднизон и его аналоги, дексаметазон и аминоглютетимид; прогестин, такой как гидроксипрогестерон капроат, медроксипрогестерона ацетат и мегестрола ацетат; эстрогены, такие как диэтилстильбэстрол и этинилэстрадиоловые эквиваленты; антиэстроген, например, тамоксифен; андрогены, включая тестостерон пропионат и флуоксиместерон/эквиваленты; антиандрогены, такие как флутамид, аналоги гонадотропин-рилизинг-гормона и лейпролид; нестероидные антиандрогены, такие как флутамид; ингибиторы киназы, ингибиторы гистоновой деацетилазы, ингибиторы метилирования, ингибиторы протеасомы, моноклональные антитела, оксиданты, антиоксиданты, ингибиторы теломеразы, миметики BH3, ингибиторы убиквитин-лигазы, ингибиторы статинов и ингибиторы рецепторной тирозинкиназы, такие как иматиниб мезилат (продается под названием Gleevac или Glivac) и эрлотиниб (ингибитор рецептора EGF) в настоящее время продается под названием Tarveca; антивирусные препараты, такие как осельтамивир фосфат, амфотерицин B и паливизумаб;

миметики Sdi 1; семустин; ингибитор 1 старения; спарфосовая кислота; спикамицин D; спиромустин; спленопентин; спонгистатин 1; скваламин; стипиамид; ингибиторы стромелизина; сульфинозин; суперактивный антагонист вазоактивного кишечного пептида; веларесол; верамин; вердины; вертепорфин; винорелбин; винксалтин; витаксин; ворозол; занотерон; зениплатин; виласкорб и зиностатин стималамер; низкомолекулярный ингибитор PI3Kβ, GSK2636771; ингибитор пан-PI3K (BKM120); ингибиторы BRAF. Вемурафениб (Зелбораф) и дабрафениб (Тафинлар); или любой аналог, производное и вариант вышеуказанного.

[0510] Радиотерапевтические агенты и факторы включают излучение и волны, которые вызывают повреждение ДНК, например, γ-излучение, рентгеновские лучи, УФ-излучение, микроволны, электронные излучения, радиоизотопы и тому подобное. Терапия может быть достигнута путем облучения локализованного участка опухоли вышеописанными видами излучения. Наиболее вероятно, что все эти факторы оказывают влияние на широкий спектр повреждений ДНК, на предшественников ДНК, на репликацию и репарацию ДНК, а также на сборку и поддержание хромосом. Диапазон доз рентгеновского излучения варьируется от ежедневных доз в 50-200 рентген в течение длительного времени (3-4 недели) до разовых доз в 2000-6000 рентген. Дозы радиоизотопов варьируются в широких пределах и зависят от периода полураспада изотопа, силы и типа испускаемого излучения, а также от поглощения неопластическими клетками.

[0511] В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтический агент может быть иммуномодулирующим агентом, таким как леналидомид (LEN). Недавние исследования показали, что леналидомид может усиливать противоопухолевые функции CAR-модифицированных Т-клеток (Otahal et al., *Oncoimmunology*, 2015, 5(4): e1115940). Некоторые примеры противоопухолевых антител включают тоцилизумаб, силтуксимаб.

[0512] Другие агенты, которые могут быть использованы в комбинации с композициями по изобретению, могут также включать агенты, которые влияют на регуляцию рецепторов клеточной поверхности и их лигандов, таких как Fas/Fas-лиганд, DR4 или DR5/TRAIL и GAP-соединения, цитостатические и дифференцирующие агенты, ингибиторы клеточной адгезии, такие как ингибиторы фокальной адгезионной киназы (FAK) и ловастатин, или агенты, которые повышают чувствительность гиперпролиферативных клеток к индукторам апоптоза, такие как антитело C225, но не ограничиваются ими.

[0513] Комбинации могут включать одновременное или раздельное введение композиций по изобретению и других агентов. В качестве альтернативы, настоящая иммунотерапия может предшествовать или следовать за другим агентом/терапией с интервалом от нескольких минут, дней, недель до нескольких месяцев.

4. Заболевания

[0514] В настоящем изобретении предложен способ уменьшения объема или нагрузки опухоли у субъекта, нуждающегося в этом, способ включает введение субъекту композиции по изобретению.

[0515] В настоящем изобретении также предложены способы лечения рака у субъекта, включающие введение субъекту эффективного количества эффекторной иммунной клетки, генетически модифицированной для экспрессии по меньшей мере одного эффекторного модуля CA2 по изобретению.

Рак

[0516] Различные раковые заболевания можно лечить с помощью фармацевтических композиций, биоциклов CA2, компонентов биоциклов CA2, эффекторных модулей CA2, включая их SRE, или полезных нагрузок по настоящему изобретению. Как используется в настоящем документе, термин «рак» относится к любому из различных злокачественных новообразований, характеризующихся распространением анапластических клеток, которые склонны к вторжению в окружающие ткани и метастазированию в новые участки тела, а также относится к патологическому состоянию, характеризующемуся такими злокачественными неопластическими образованиями. Рак может быть опухолью или гематологическим злокачественным новообразованием и включает в себя все виды лимфом/лейкемий, карцином и сарком, например, рак или опухоли, обнаруженные в анусе, мочевом пузыре, желчных протоках, костях, мозге, груди, шейке матки, толстой/прямой кишке, эндометрии, пищеводе, глазах, желчном пузыре, голове и шее, печени, почках, гортани, легких, средостении (груди), ротовой полости, яичниках, поджелудочной железе, половом члене, простате, коже, тонком кишечнике, желудке, спинном мозге, копчике, яичках, щитовидной железе и матке, но не ограничивается ими.

[0517] Типы карцином, которые можно лечить композициями по настоящему изобретению, включают папиллому/карциному, хориокарциному, опухоль эндодермального синуса, тератому, аденому/аденокарциному, меланому, фиброму, липому, лейомиому, рабдомиому, мезотелиому, ангиому, остеому, хондрому, глиому, лимфому/лейкемию, плоскоклеточную карциному, мелкоклеточную карциному, крупноклеточную недифференцированную карциному, базальноклеточную карциному и синоназальную недифференцированную карциному, но не ограничиваются ими.

[0518] Типы сарком, которые можно лечить композициями по настоящему изобретению, включают саркому мягких тканей, такую как альвеолярная саркома мягких тканей, ангиосаркома, дерматофибросаркома, десмоидная опухоль, десмопластическая мелкокруглоклеточная опухоль, внекостная хондросаркома, внекостная остеосаркома, фибросаркома, гемангиоперицитома, гемангиосаркома, саркома Капоши, лейомиосаркома, липосаркома, лимфангиосаркома, лимфосаркома, злокачественная фиброзная гистиоцитома, нейрофибросаркома, рабдомиосаркома, синовиальная саркома и опухоль Аскина, саркома Юинга (примитивная нейроэктодермальная опухоль), злокачественная гемангиоэндотелиома, злокачественная шваннома, остеосаркома и хондросаркома, но не ограничиваются ими.

Инфекционные заболевания

[0519] В некоторых вариантах осуществления биоциклы CA2 по изобретению могут быть использованы для лечения инфекционных заболеваний. Биоциклы CA2 по изобретению могут быть введены в клетки, подходящие для адоптивного переноса клеток, такие как макрофаги, дендритные клетки, естественные клетки-киллеры и/или Т-клетки. Инфекционные заболевания, лечащиеся биоциклами CA2 по изобретению, могут быть заболеваниями, вызванными вирусами, бактериями, грибами и/или паразитами. Полезные нагрузки IL15-IL15Ra по изобретению могут быть использованы для увеличения пролиферации иммунных клеток и/или персистенции иммунных клеток, применимых при лечении инфекционных заболеваний.

[0520] «Инфекционные заболевания» в данном случае относятся к заболеваниям, вызванным любым патогеном или агентом, который инфицирует клетки млекопитающих, предпочтительно человека, и вызывает болезненное состояние. Их примеры включают бактерии, дрожжи, грибы, простейшие, микоплазмы, вирусы, прионы и паразиты. Примеры включают те, которые участвуют в (а) вирусных заболеваниях, таких как,

например, заболевания, возникающие в результате инфицирования аденовирусом, герпесвирусом (например, HSV-I, HSV-II, CMV или VZV), поксвирусом (например, ортопоксвирус, такой как вирус ветряной оспы или коровьей оспы, или вирусом контагиозного моллюска), пикорнавирусом (например, риновирус или энтеровирус), ортомиксовирусом (например, гриппозный вирус), парамиксовирусом (например, вирус парагриппа, вирус паротита, вирус кори и респираторно-синцитиальный вирус (RSV)), коронавирусом (например, SARS), паповавирусом (например, папилломавирусы, такие как те, которые вызывают генитальные бородавки, обыкновенные бородавки или подошвенные бородавки), гепаднавирусом (например, вирус гепатита B), флавивирусом (например, вирус гепатита C или вирус Денге) или ретровирусом (например, лентивирус, такой как ВИЧ); (b) бактериальных заболеваниях, таких как, например, заболевания, возникающие в результате инфицирования бактериями, например, рода Escherichia, Enterobacter, Salmonella, Staphylococcus, Shigella, Listeria, Aerobacter, Helicobacter, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas, Streptococcus, Chlamydia, Mycoplasma, Pneumococcus, Neisseria, Clostridium, Bacillus, Corynebacterium, Mycobacterium, Campylobacter, Vibrio, Serratia, Providencia, Chromobacterium, Brucella, Yersinia, Haemophilus или Bordetella; (c) других инфекционных заболеваниях, таких как хламидиоз, грибковые заболевания, включая, помимо прочего, кандидоз, аспергиллез, гистоплазмоз, криптококковый менингит, паразитарные заболевания, включая, помимо прочего, малярию, пневмонию, вызванную Pneumocystis carnii, лейшманиоз, криптоспоридиоз, токсоплазмоз и трипаносомную инфекцию, и прионы, вызывающие заболевания человека, такие как болезнь Крейтцфельдта-Якоба (CJD), вариант болезни Крейтцфельдта-Якоба (vCJD), синдром Герстмана-Штраусслера-Шейнкера, фатальная семейная бессонница и Куру.

Комбинированное лечение

[0521] Изобретение дополнительно относится к применению фармацевтических композиций, биоциклов CA2, компонентов биоциклов CA2, эффекторных модулей CA2, включая их SRE или полезные нагрузки по настоящему изобретению для лечения одной или более форм рака, в комбинации с другими фармацевтическими препаратами и/или другими терапевтическими методами, например, с известными фармацевтическими препаратами и/или известными терапевтическими методами, такими как, например, те, которые в настоящее время используются для лечения этих заболеваний. Например, фармацевтические композиции, биоциклы CA2, компоненты биоциклов CA2, эффекторные модули CA2, включая их SRE или полезные нагрузки по настоящему изобретению могут также вводиться в сочетании с одним или более дополнительными противораковыми способами лечения, такими как биологическая, химио- и радиотерапия. Соответственно, лечение может включать, например, иматиниб (Gleevac), полностью транс-ретиноевую кислоту, лечение моноклональными антителами (гемтузумаб, озогамицин), химиотерапию (например, хлорамбуцил, преднизон, преднизолон, винкристин, цитарабин, клофарабин, ингибиторы фарнезилтрансферазы, децитабин, ингибиторы MDR1), ритуксимаб, интерферон-α, антрациклиновые препараты (такие как даунорубицин или идарубицин), L-аспарагиназу, доксорубицин, циклофосфамид, доксорубицин, блеомицин, флударабин, этопозид, пентостатин или кладрибин), пересадку костного мозга, трансплантацию стволовых клеток, лучевую терапию, антиметаболитные препараты (метотрексат и 6-меркаптопурин) или любое из антител, описанных в Таблице 5 международной публикации № WO2017/180587 (содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте) или их комбинации.

Комбинации с лучевой терапией

[0522] Лучевая терапия (также называемая радиотерапией, рентгенотерапией или облучением) - это применение ионизирующего излучения для уничтожения раковых клеток и уменьшения размеров опухолей. Лучевая терапия может проводиться наружно с помощью радиотерапии внешним лучом (EBRT) или внутренне с помощью брахитерапии. Эффект от лучевой терапии локализован и ограничивается областью лечения. Лучевая терапия может применяться для лечения практически всех типов солидных опухолей, включая рак мозга, молочной железы, шейки матки, гортани, легких, поджелудочной железы, простаты, кожи, желудка, матки или саркомы мягких тканей. Облучение также используется для лечения лейкемии и лимфомы.

Комбинация с химиотерапией

[0523] Химиотерапия - это лечение рака с помощью лекарств, которые уничтожают раковые клетки. В текущем употреблении термин «химиотерапия» обычно относится к цитотоксическим препаратам, которые воздействуют на быстро делящиеся клетки в целом, в отличие от направленной терапии. Химиотерапевтические препараты вмешиваются в процесс деления клеток различными возможными способами, например, с дупликацией ДНК или разделением вновь образованных хромосом. Большинство видов химиотерапии направлены на все быстро делящиеся клетки и не являются специфическими для раковых клеток, хотя некоторая степень специфичности может быть обусловлена неспособностью многих раковых клеток восстанавливать повреждения ДНК, в то время как нормальные клетки обычно могут это делать.

[0524] Большинство схем химиотерапии назначаются в комбинации. Примерные химиотерапевтические агенты включают, помимо прочего, энхансер 5-FU, 9-AC, AG2037, AG3340, ингибитор аггреканазы, аминоглютетимид, амсакрин (m-AMSA), аспарагиназу, азацитидин, батимастат (BB94), BAY 12-9566, BCH-4556, бис-нафталимид, бусульфан, капецитабин, карбоплатин, осан 6

[0525] ингибиторы cdk4/cdk2, хлорбуцил, CI-994, цисплатин, кладрибин, CS-682, цитарабин HCl, D2163, дактиномицин, даунорубицин HCl, DepoCyt, дексифосамид, доцетаксел, доластайн, доксифлуридин, доксорубицин, DX8951f, E 7070, EGFR, эпирубицин, эритропоэтин, эстрамустин фосфат натрия, этопозид (VP16-213), ингибитор фарнезилтрансферазы, FK 317, флавопиридол, флоксуридин, флударабин, флуороурацил (5-FU), флутамид, фрагилин, гемцитабин, гексаметилмеламин (HMM), гидроксимочевину (гидроксикарбамид), ифосфамид, интерферон альфа-2a, интерферон альфа-2b, интерлейкин-2, иринотекан, ISI 641, крестин, лемонал DP 2202, лейпролид ацетат (аналог LHRH-рилизинг-фактора), левамизол, LiGLA (литий-гамма-линоленат), «зерна» йода, лометексол, ломустин (CCNU), маримистат, мехлорэтамин HCl (азотистый иприт), мегестрола ацетат, мегламин GLA, меркаптопурин, месна, митогуазон (метил-GAG; метилглиоксаль бис-гуанилгидразон; MGBG), митотан (o.p'-DDD), митоксантрон, митоксантрон HCl, MMI 270, MMP, MTA/LY 231514, октреотид, ODN 698, OK-432, пероральная платина, пероральный таксоид, паклитаксел (TAXOL.RTM.), ингибиторы PARP, PD 183805, пентостатин (2'-дезоксикоформицин), PKC 412, пликамицин, прокарбазин HCl, PSC 833, ралитрексед, ингибитор фарнезилтрансферазы RAS, ингибитор онкогена RAS, семустин (метил-CCNU), стрептозоцин, сурамин, тамоксифен цитрат, аналог таксана, темозоломид, тенипозид (VM-26), тиогуанин, тиотепу, топотекан, тирозинкиназу, UFT (Тегафур/Урацил), вальрубицин, винбластинсульфат, виндезинсульфат, VX-710, VX-853, YM 116, ZD 0101, ZD 0473/Anormed, ZD 1839, ZD 9331.

Иммуноонкология и клеточная терапия

[0526] Недавний прогресс в области иммунологии рака позволил разработать несколько подходов, помогающих иммунной системе сдерживать рак. Такие подходы к иммунотерапии включают нацеливание на раковые антигены с помощью моноклональных антител или путем адоптивного переноса ex vivo сконструированных Т-клеток (например, содержащих химерные антигенные рецепторы или сконструированные Т-клеточные рецепторы).

[0527] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, биоциклы CA2, компоненты биоциклов CA2, эффекторные модули CA2, включая их SRE, или полезные нагрузки по настоящему изобретению могут быть использованы для модуляции, изменения или эксплуатации иммунной системы для воздействия на один или более видов рака. Этот подход может также рассматриваться с другими подобными биологическими подходами, например, терапия, изменяющая иммунный ответ, такая как введение интерферонов, интерлейкинов, колониестимулирующих факторов, других моноклональных антител, вакцин, генная терапия и неспецифические иммуномодулирующие агенты также рассматриваются как противораковые способы лечения, которые могут быть объединены с фармацевтическими композициями, биоциклами CA2, компонентами биоциклов CA2, эффекторными модулями CA2, включая их SRE или полезные нагрузки по настоящему изобретению.

[0528] Иммунотерапия рака - это разнообразный набор терапевтических стратегий, направленных на стимулирование собственной иммунной системы пациента для борьбы с раком. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, биоциклы CA2, компоненты биоциклов CA2, эффекторные модули CA2, включая их SRE, или полезные нагрузки по настоящему изобретению разработаны как иммуноонкологические терапевтические средства.

Клеточная терапия

[0529] Существует несколько видов клеточной иммунотерапии, включая терапию опухолевыми инфильтрирующими лимфоцитами (TIL), генетически сконструированными Т-клетками, несущими химерные антигенные рецепторы (CAR), и технологию рекомбинантных ТКР.

[0530] Согласно настоящему изобретению, биоциклы и системы CA2 могут быть использованы при разработке и внедрении клеточной терапии, такой как адоптивная клеточная терапия. Некоторые эффекторные модули CA2, применимые в клеточной терапии, представлены на Фиг. 8-13 международной публикации WO 2017/180587 (содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте). Биоциклы CA2, эффекторные модули CA2 и их SRE и полезные нагрузки могут быть использованы в клеточной терапии для удаления ТКР-рразрушения генов ТКР, конструирования ТКР, для регулирования рецепторов, меченных эпитопами, в платформах АПК для стимуляции Т-клеток, в качестве инструмента для улучшения стимуляции АПК ex vivo, для улучшения методов размножения Т-клеток, при стимуляции антигеном ex vivo, в комбинациях ТКР/CAR, для манипуляции или регулирования TIL, в аллогенной клеточной терапии, в комбинированной терапии Т-клетками с другими линиями лечения (например, радиация, цитокины), для кодирования сконструированных ТКР или модифицированных ТКР, или для усиления Т-клеток, отличных от ТКР (например, путем введения генов цитокинов, генов ингибиторов контрольных точек PD1, CTLA4).

[0531] В некоторых вариантах осуществления при использовании клеточной терапии достигаются улучшенные показатели ответа.

[0532] Размножение и персистенция популяций клеток может быть достигнуто путем регулирования или тонкой настройки полезной нагрузки, например, рецепторов или компонентов метаболического пути в Т-клетках, NK-клетках или других клетках, связанных с иммунитетом. В некоторых вариантах осуществления биоциклы CA2, SRE или эффекторные модули CA2 предназначены для пространственного и/или временного контроля экспрессии белков, которые усиливают ответ Т-клеток или NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления биоциклы CA2, SRE или эффекторные модули CA2 предназначены для пространственного и/или временного контроля экспрессии белков, которые ингибируют ответ Т-клеток или NK-клеток.

[0533] В некоторых вариантах осуществления биоциклы CA2, SRE или эффекторные модули CA2 предназначены для изменения микроокружения опухоли, чтобы расширить пригодность биоциклов или фармацевтической композиции за пределы прямого уничтожения клеток.

[0534] В некоторых вариантах осуществления биоциклы CA2, SRE или эффекторные модули CA2 предназначены для уменьшения, смягчения или устранения цитокинового шторма CAR. В некоторых вариантах осуществления такое снижение, смягчение и/или устранение происходит в солидных опухолях или микроокружениях опухоли.

[0535] В некоторых вариантах осуществления эффекторные модули CA2 могут кодировать один или более цитокинов.

[0536] В некоторых вариантах осуществления эффекторные модули CA2 по настоящему изобретению, используемые для размножения клеток, могут включать полезную нагрузку, включающую любой из генов суперсемейства Ras.

[0537] Иммунную систему можно использовать для лечения не только раковых заболеваний. Биоциклы CA2, их компоненты, SRE или эффекторные модули CA2 могут быть использованы в иммунотерапии для лечения заболеваний, включая, помимо прочего, аутоиммунные заболевания, аллергию, болезнь трансплантат против хозяина, а также заболевания и расстройства, которые могут привести к иммунодефициту, например, синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД).

[0538] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка по настоящему изобретению может представлять собой химерный антигенный рецептор (CAR), который при трансдукции в иммунные клетки (например, Т-клетки и NK-клетки) может перенаправлять иммунные клетки против мишени (например, опухолевой клетки), которая экспрессирует молекулу, распознаваемую внеклеточным нацеливающим CAR.

[0539] В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент конструкции CAR может быть природным лигандом молекулы-мишени или ее вариантом и/или фрагментом, способным связывать молекулу-мишень. В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент CAR может быть рецептором молекулы-мишени.

[0540] В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент CAR может распознавать опухолеспецифический антиген (TSA), например, раковый неоантиген, экспрессия которого ограничена опухолевыми клетками.

[0541] В качестве неограничивающих примеров CAR по настоящему изобретению может включать внеклеточный нацеливающий домен, способный связываться с опухолеспецифическим антигеном, выбранным из 5T4, 707-AP, A33, AFP (α-фетопротеин), якорного белка киназы 4 (AKAP-4), ALK, α5β1-интегрина, рецептора андрогенов, аннексина II, альфа-актинина-4, ART-4, B1, B7H3, B7H4, BAGE (антиген

меланомы В), BCMA, слитого белка BCR-ABL, бета-катенина, BKT-антигена, BTAA, CA-I (карбоангидраза I), CA50 (раковый антиген 50), CA125, CA15-3, CA195, CA242, калретинина, CAIX (карбоангидраза), CAMEL (распознаваемый цитотоксическими Т-лимфоцитами антиген на меланоме), CAM43, CAP-1, каспазы-8/m, CD4, CD5, CD7, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD27, CD27/m, CD28, CD30, CD33, CD34, CD36, CD38, CD40/CD154, CD41, CD44v6, CD44v7/8, CD45,CD49f, CD56, CD68\KP1, CD74, CD79a/CD79b, CD103, CD123, CD133, CD138, CD171, cdc27/m, CDK4 (циклинзависимая киназа 4), CDKN2A, CDS, CEA (карциноэмбриональный антиген), CEACAM5, CEACAM6, хромогранина, c-Met, c-Myc, coa-1, CSAp, CT7, CT10, циклофилина В, циклина В1, цитоплазматических тирозинкиназ, цитокератина, DAM-10, DAM-6, слитого белка dek-can, десмина, DEPDC1 (белок 1, содержащий DEP-домен), E2A-PRL, EBNA, EGF-R (рецептор эпидермального фактора роста), EGP-1(эпителиальный гликопротеин-1) (TROP-2), EGP-2, EGP-40, EGFR (рецептор эпидермального фактора роста), EGFRvIII, EF-2, ELF2M, EMMPRIN, EpCAM (молекула адгезии эпителиальных клеток), EphA2, антигенов вируса Эпштейна Барр, Erb (ErbB1; ErbB3; ErbB4), ETA (эпителиальный опухолевый антиген), слитого белка ETV6-AML1, FAP (белок активации фибробластов), FBP (фолат-связывающий белок), FGF-5, рецептора фолата α, FOS-родственного антигена 1, фукозила GM1, G250, GAGE (GAGE-1; GAGE-2), галактина, GD2 (ганглиозид), GD3, GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок), GM2 (онкофетальный антиген-иммуногенный-1; OFA-I-1), GnT-V, Gp100, H4-RET, HAGE (хеликазный антиген), HER-2/neu, HIF (индуцибельные факторы гипоксии), HIF-1α, HIF-2α, HLA-A2, HLA-A*0201-R170I, HLA-Al l, HMWMAA, Hom/Mel-40, HSP70-2M (Белок теплового шока 70), HST-2, HTgp-175, hTERT (или hTRT), вируса папилломы человека-E6/ вируса папилломы человека-E7 и E6, iCE (иммунозахват ФИА), IGF-1R, IGH-IGK, IL2R, IL5, ILK (интегринсвязывающая киназа), IMP3 (инсулиноподобный фактор роста II мРНК-связывающего белка 3), IRF4 (регуляторный фактор интерферона 4), KDR (рецептор со встроенным киназным доменом), KIAA0205, KRAB-белка с цинковым пальцем (KID)-3; KID31, KSA (17-1A), K-ras, LAGE, LCK, LDLR/FUT (слитый белок LDLR-фукозилтрансферазыAS), LeY (Lewis Y), MAD-CT-1, MAGE (тирозиназа, меланома-ассоциированный антиген) (MAGE-1; MAGE-3), опухолевого антигена мелан-A (MART), MART-2/Ski, MC1R (рецептор меланокортина 1), MDM2, мезотелина, MPHOSPH1, MSA(мышечно-специфический актин), mTOR (мишени рапамицина млекопитающих), MUC-1, MUC-2, MUM-1 (меланома-ассоциированный (мутированный) антиген 1), MUM-2, MUM-3, Миозина/м, MYL-RAR, NA88-A, N-ацетилглюкозаминилтрансферазы, neo-PAP, NF-KB (ядерный фактор-каппа В), нейрофиламента, NSE (нейрон-специфическая энолаза), рецепторов Notch, NuMa, N-Ras, NY-BR-1, NY-CO-1, NY-ESO-1, онкостатина M, OS-9, OY-TES1, мутантов p53, p190 minor bcr-abl, pl5(58), pl85erbB2, pl80erbB-3, PAGE (ген, ассоциированный с предстательной железой), PAP (простатическая кислая фосфатаза), PAX3, PAX5, PDGFR (рецептор тромбоцитарного фактора роста), цитохрома P450, участвующего в утилизации пиперидинов и пирролидинов (PIPA), слитого белка Pml-RAR альфа, PR-3 (протеиназа 3), PSA (простата-специфический антиген), PSM, PSMA (антиген стволовых клеток предстательной железы), PRAME (преимущественно экспрессируемый антиген меланомы), PTPRK, RAGE (антиген почечной опухоли), Raf (A-Raf, B-Raf и C-Raf), Ras, рецепторных тирозинкиназ, RCAS1, RGSS, ROR1 (орфанный рецептор типа рецепторной тирозинкиназы 1), RU1, RU2, SAGE, SART-1, SART-3, SCP-1, SDCCAG16, SP-17 (белок спермы 17), src-семейства, SSX (точка останова X синовиальной саркомы)-1, SSX-2(HOM-MEL-40), SSX-3, SSX-4, SSX-5, STAT-3, STAT-5, STAT-6, STEAD, STn, сурвивина, syk-ZAP70, TA-90 (Мак-2-связывающий белок\циклофилин C-ассоциированный белок), TAAL6, TACSTD1 (опухолеассоциированный трансдуктор кальциевого сигнала 1),

TACSTD2, TAG-72-4, TAGE, TARP (белок альтернативной рамки считывания Т-клеточного рецептора гамма), слитого белка TEL/AML1, TEM1, TEM8 (эндосиалин или CD248), TGFβ, TIE2, TLP, ген слияния ETS TMPRSS2, TNF-рецептора (рецептор TNF-α, рецептор TNF-β или рецептор TNF-γ), рецептора трансферрина, TPS, TRP-1 (тирозин-связанный белок 1), TRP-2, TRP-2/INT2, TSP-180, рецептора VEGF, WNT, WT-1 (антиген опухоли Вильмса) и XAGE.

[0542] В качестве неограничивающих примеров, нацеливающий фрагмент по настоящему изобретению может представлять собой антитело scFv, распознающее опухоль-специфический антиген (TSA), например, scFv антител SS, SS1 и HN1, которые специфически распознают и связываются с мезотелином человека (патент США № 9359447), scFv антитела GD2 (патент США № 9315585), антигенсвязывающий домен CD19 (патент США № 9328156); лигандсвязывающий домен NKG2D (патент США № 9273283; патентная публикация США № US 20160311906 A1); человеческие анти-мезотелиновые scFv, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11 и 12 по патенту США 9272002; анти-CS1-связывающий агент (патентная публикация США № US 20160075784); анти-BCMA-связывающий домен (международная патентная публикация № WO 2016/014565); анти-CD19 scFv антитела SEQ ID NO: 20 по патенту США № 9102761; GFR альфа 4 антигенсвязывающие фрагменты, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 59 и 79 по международной патентной публикации № 2016/025880; анти-CLL-1 (лектиноподобная мекула 1 С-типа) связывающие домены, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO::47, 44, 48, 49, 50, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 51, 73, 70, 74, 75, 76, 65, 66, 67, 68, 69, 71, 72, 77, 195, 86, 83, 87, 88, 89, 78, 79, 80, 81, 82, 84, 85, 90 и 196 по международной патентной публикации № WO 2016014535); CD33-связывающие домены, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 39-46 по международной патентной публикации № WO 2016014576; GPC3 (глипикан-3) связывающий домен (SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4 по международной патентной публикации № WO 2016036973); GFR альфа4- (гликозил-фосфатидилинозитол (GPI)-связанный рецептор на клеточной поверхности, α-рецептор 4 семейства GDNF) связывающий домен (международная патентная публикация № WO 2016025880); CD123-связывающие домены, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 480, 483, 485, 478, 158, 159, 160, 157, 217, 218, 219, 216, 276, 277, 278 и 275 по международной патентной публикации № WO 20160258896; антитело против ROR1 или его фрагменты (международная патентная публикация № WO 2016016344); scFvs, специфичные к GPC-3 (SEQ ID NO: 1 и 24 по международной патентной публикации № WO 2016049459); scFv для CSPG4 (SEQ ID NO: 2 по международной патентной публикации № WO 2015080981; scFv для рецептора фолата альфа (патентная публикация США № US 20170002072 A1); содержание каждого из которых включено в настоящий документ путем ссылки во всей своей полноте.

[0543] Внутриклеточный домен слитого полипептида CAR после связывания с целевой молекулой передает сигнал эффекторной иммунной клетке, активируя по меньшей мере одну из нормальных эффекторных функций эффекторных иммунных клеток, включая цитолитическую активность (например, секрецию цитокинов) или хелперную активность. Таким образом, внутриклеточный домен включает в себя «внутриклеточный сигнальный домен» Т-клеточного рецептора (ТКР). В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен по настоящему изобретению может содержать сигнальные мотивы, которые известны как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы (ITAM). В некоторых вариантах осуществления внутриклеточная область по настоящему изобретению дополнительно включает один или более костимулирующих сигнальных доменов, которые обеспечивают дополнительные

сигналы эффекторным иммунным клеткам. Эти костимулирующие сигнальные домены в комбинации с сигнальным доменом могут дополнительно улучшить размножение, активацию, память, персистенцию и эффективность уничтожения опухолей иммунных клеток, сконструированными по технологии CAR (например, CAR Т-клеток). В некоторых случаях костимулирующая сигнальная область содержит 1, 2, 3 или 4 цитоплазматических домена одной или более внутриклеточных сигнальных и/или костимуляторных молекул.

[0544] В одном варианте осуществления CAR по настоящему изобретению представляет собой CD19-специфичный CAR. В контексте изобретения эффекторный модуль может включать ДД CA2, функционально связанный со слитой конструкцией CAR CD19.

[0545] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, биоциклы CA2, компоненты биоциклов CA2, эффекторные модули CA2, включая их SRE, или полезные нагрузки по настоящему изобретению могут быть использованы для модуляции, изменения или эксплуатации иммунной системы для нацеливания на один или более видов аутореактивных иммунных компонентов, таких как аутоантитела и аутореактивные иммунные клетки, для ослабления аутоиммунных заболеваний. В некоторых вариантах осуществления, SRE по настоящему изобретению могут быть использованы для регулирования или настройки Т-клеточной терапии на основе рецептора химерных аутоантител (CAAR), чтобы оптимизировать ее пригодность в лечении аутоиммунных заболеваний (Ellebrecht C.T. et al., Science. 2016. Jul 8;353(6295):179-84; содержание которого полностью включено в настоящий документ путем ссылки). В некоторых вариантах осуществления биоциклы CA2, SRE или эффекторные модули CA2 предназначены для модуляции Treg с целью ослабления аутоиммунных заболеваний. В таком случае IL2 можно регулировать с помощью одного настроенного модуля или модуля с несколькими настроенными функциями, как описано в настоящем документе.

[0546] В некоторых вариантах осуществления биоциклы CA2, SRE или эффекторные модули CA2 могут быть использованы в иммунотерапии для ослабления или уменьшения болезни трансплантат против хозяина (GVHD). GVHD - это состояние после пересадки стволовых клеток или костного мозга, когда иммунные клетки аллогенного донора реагируют против тканей хозяина. В некоторых вариантах осуществления биоциклы CA2, SRE или эффекторные модули CA2 предназначены для модуляции Treg для лечения GVHD. В одном варианте осуществления биоциклы CA2, содержащие эффекторный модуль CA2, кодирующий TNF-альфа, могут использоваться для модуляции Treg с целью минимизации GVHD (Pierini, A. et al., Blood. 2016. Aug 11; 128(6):866-71; содержание которого полностью включено в настоящий документ путем ссылки).

[0547] В некоторых вариантах осуществления биоциклы CA2, SRE или эффекторные модули CA2 разработаны таким образом, чтобы быть значительно менее иммуногенными, чем другие биоциклы или переключатели в данной области.

[0548] Как используется в настоящем документе, «значительно менее иммуногенный» означает обнаруживаемое снижение иммуногенности. В другом варианте осуществления термин относится к снижению иммуногенности в несколько раз. В другом варианте осуществления этот термин относится к снижению, такому, что эффективное количество биоциклов CA2, SRE или эффекторных модулей CA2, которые могут быть введены, не вызывает детектируемого иммунного ответа. В другом варианте осуществления термин относится к снижению, такому, что биоциклы CA2, SRE или эффекторные модули

CA2 могут быть многократно введены без вызывания иммунного ответа. В другом варианте осуществления, снижение является таким, что биоциклы CA2, SRE или эффекторные модули CA2 могут быть многократно введены, не вызывая иммунного ответа.

[0549] В другом варианте осуществления биоциклы CA2, SRE или эффекторные модули CA2 в 2 раза менее иммуногенны, чем их немодифицированный аналог или эталонное соединение. В другом варианте осуществления иммуногенность снижается в 3 раза. В другом варианте осуществления иммуногенность снижается в 5 раз. В другом варианте осуществления иммуногенность снижается в 7 раз. В другом варианте осуществления иммуногенность снижается в 10 раз. В другом варианте осуществления иммуногенность снижается в 15 раз. В другом варианте осуществления иммуногенность снижается в кратное количество раз. В другом варианте осуществления иммуногенность снижается в 50 раз. В другом варианте осуществления иммуногенность снижается в 100 раз. В другом варианте осуществления иммуногенность снижается в 200 раз. В другом варианте осуществления иммуногенность снижается в 500 раз. В другом варианте осуществления иммуногенность снижается в 1000 раз. В другом варианте осуществления иммуногенность снижается в 2000 раз. В другом варианте осуществления иммуногенность снижается в кратную разницу.

[0550] Методы определения иммуногенности хорошо известны в данной области и включают, например, измерение секреции цитокинов (например, IL12, IFN-альфа, TNF-альфа, RANTES, MIP-1альфа или бета, IL6, IFN-бета или IL8), измерение экспрессии маркеров активации DC (например, CD83, HLA-DR, CD80 и CD86), или измерение способности действовать в качестве адъюванта для адаптивного иммунного ответа.

Заболевания и токсины

[0551] Различные инфекционные заболевания можно лечить с помощью фармацевтических композиций, биоциклов CA2, компонентов биоциклов CA2, эффекторных модулей CA2, включая их SRE, или полезных нагрузок по настоящему изобретению. Как используется в настоящем документе, термин «инфекционное заболевание» относится к любым расстройствам, вызванным такими организмами, как бактерии, вирусы, грибы или паразиты.

[0552] Различные токсины можно лечить с помощью фармацевтических композиций, биоциклов CA2, компонентов биоциклов CA2, эффекторных модулей CA2, включая их SRE, или полезных нагрузок по настоящему изобретению. Неограниченные примеры токсинов включают рицин, Bacillus anthracis, токсин Шига и Шига-подобный токсин, токсины Botulinum.

[0553] Различные тропические заболевания можно лечить с помощью фармацевтических композиций, биоциклов CA2, компонентов биоциклов CA2, эффекторных модулей CA2, включая их SRE, или полезных нагрузок по настоящему изобретению. Неограничивающие примеры тропических заболеваний включают лихорадку Чикунгунья, лихорадку Денге, болезнь Шагаса, бешенство, малярию, вирус Эбола, вирус Марбург, вирус Западного Нила, желтую лихорадку, вирус японского энцефалита, вирус энцефалита Сент-Луис.

[0554] Различные заболевания пищевого происхождения и гастроэнтериты можно лечить с помощью фармацевтических композиций, биоциклов CA2, компонентов биоциклов CA2, эффекторных модулей CA2, включая их SRE, или полезных нагрузок по настоящему изобретению. Неограничивающие примеры заболеваний пищевого происхождения и гастроэнтеритов включают ротавирус, вирус Норвалк (норовирус), Campylobacter jejuni, Clostridium difficile, Entamoeba histolytica, Helicobacter pylori, энтеротоксин B

золотистого стафилококка, вирус гепатита A (HAV), гепатит E, Listeria monocytogenes, Salmonella, Clostridium perfringens и Salmonella.

[0555] Различные инфекционные агенты можно лечить с помощью фармацевтических композиций, биоциклов CA2, компонентов биоциклов CA2, эффекторных модулей CA2, включая их SRE, или полезных нагрузок по настоящему изобретению. Различные инфекционные агенты можно лечить фармацевтическими композициями, биоциклами CA2, компонентами биоциклов CA2, эффекторными модулями CA2, включая их SRE, или полезными нагрузками по настоящему изобретению. Неограничивающие примеры инфекционных агентов включают аденовирусы, *Anaplasma phagocytophilium, Ascaris lumbricoides, Bacillus anthracis, Bacillus cereus, Bacteriodes sp*, вирус Бармахского леса, *Bartonella bacilliformis, Bartonella henselae, Bartonella quintana*, бета-токсин *Clostridium perfringens, Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis, Borrelia burgdorferi, Borrelia miyamotoi, Borrelia recurrentis, Borrelia sp.*, Ботулотоксин, *Brucella sp., Burkholderia pseudomallei*, вирус калифорнийского энцефалита, *Campylobacter, Candida albicans*, вирус чикунгунья, *Chlamydia psittaci, Chlamydia trachomatis, Clonorchis sinensis, Clostridium difficile bacteria, Clostridium tetani*, вирус клещевой лихорадки Колорадо, *Corynebacterium diphtheriae, Corynebacterium minutissimum, Coxiella burnetii*, коксаки A, коксаки B, вирус геморрагической лихорадки Крым-Конго, цитомегаловирус, вирус денге, вирус восточного лошадиного энцефалита, вирусы Эбола, эховирус, *Ehrlichia chaffeensis., Ehrlichia equi., Ehrlichia sp., Entamoeba histolytica, Enterobacter sp., Enterococcus faecalis*, энтеровирус 71, вирус Эпштейна-Барр (EBV), *Erysipelothrix rhusiopathiae, Escherichia coli, Flavivirus, Fusobacterium necrophorum, Gardnerella vaginalis*, стрептококк группы B, *Haemophilus aegyptius, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae*, хантавирус, *Helicobacter pylori*, гепатит A, гепатит B, гепатит C, гепатит D, гепатит E, вирус простого герпеса 1 и 2, вирус герпеса человека 6, вирус герпеса человека 8, вирус иммунодефицита человека 1 и 2, вирусы Т-клеточного лейкоза человека I и II, вирусы гриппа (A, B, C), вирус Джеймстаунского каньона, антигенный вирус японского энцефалита, вирус японского энцефалита, вирус Джона Каннинхэма, юнинвирус, вирус герпеса, ассоциированный с саркомой Капоши (KSHV), *Klebsiella granulomatis, Klebsiella sp.*, вирус киасанурской лесной болезни, вирус Ла-Кросса, лассавирус, *Legionella pneumophila, Leptospira interrogans, Listeria monocytogenes*, вирус лимфоцитарного хориоменингита, лиссавирус, мачуповирус, вирус Марбурга, вирус кори, коронавирус MERS (MERS-CoV), *Micrococcus sedentarius, Mobiluncus sp., Molluscipoxvirus, Moraxella catarrhalis, Morbilli-Rubeola virus*, вирус паротита, *Mycobacterium leprae, Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium ulcerans, Mycoplasma genitalium, Mycoplasma sp, Nairovirus, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Nocardia*, вирус Норвалка, норовирус, вирус омской геморрагической лихорадки, вирус папилломы, вирусы парагриппа 1-3, парапоксвирус, парвовирус B19, *Peptostreptococccus sp., Plasmodium sp.*, полиовирусы типов I, II и III, *Proteus sp., Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas pseudomallei, Pseudomonas sp.*, вирус бешенства, респираторно-синцитиальный вирус, рицин-токсин, *Rickettsia australis, Rickettsia conori, Rickettsia honei, Rickettsia prowazekii*, вирус реки Росс, ротавирус, рубеллавирус, энцефалит Сент-Луиса, *Salmonella Typhi, Sarcoptes scabiei*, SARS-ассоциированный коронавирус (SARS-CoV), *Serratia sp.*, Шига-токсин и Шига-подобный токсин, *Shigella sp.*, вирус Син Номбре, вирус американского зайца-беляка, *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptobacillus moniliformis, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus agalactiae, Streptococcus agalactiae*, стрептококки группы A-H, *Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Treponema pallidum subsp. Pallidum, Treponema pallidum var. carateum, Treponema pallidum var. endemicum, Tropheryma whippelii, Ureaplasma urealyticum*, вирус Варицелла-Зостер, вирус

ветряной оспы, *Vibrio cholerae*, вирус Западного Нила, вирус жёлтой лихорадки, *Yersinia enterocolitica, Yersinia pestis* и вирус Зика.

[0556] Различные редкие заболевания можно лечить с помощью фармацевтических композиций, биоциклов CA2, компонентов биоциклов CA2, эффекторных модулей CA2, включая их SRE, или полезных нагрузок по настоящему изобретению. Как используется в настоящем документе, термин «редкое заболевание» относится к любому заболеванию, которое поражает небольшой процент населения.

[0557] Различные аутоиммунные и связанные с аутоиммунными заболеваниями заболевания можно лечить с помощью фармацевтических композиций, биоциклов CA2, компонентов биоциклов CA2, эффекторных модулей CA2, включая их SRE, или полезных нагрузок по настоящему изобретению. Как используется в настоящем документе, термин «аутоиммунное заболевание» относится к заболеванию, при котором организм вырабатывает антитела, атакующие его собственные ткани. В качестве неограничивающего примера аутоиммунное заболевание может представлять собой острый диссеминированный энцефаломиелит (ОДЭМ), острый некротизирующий геморрагический лейкоэнцефалит, болезнь Аддисона, агаммаглобулинемию, алопецию ареата, амилоидоз, анкилозирующий спондилит, анти-ГБМ/анти-ТБМ нефрит, антифосфолипидный синдром (АФС), аутоиммунный ангионевротический отек, аутоиммунную апластическую анемию, аутоиммунную дизавтономию, аутоиммунный гепатит, аутоиммунную гиперлипидемию, аутоиммунный иммунодефицит, аутоиммунное заболевание внутреннего уха (АЗВУ), аутоиммунный миокардит, аутоиммунный оофорит, аутоиммунный панкреатит, аутоиммунную ретинопатию, аутоиммунную тромбоцитопеническую пурпуру (АТЦП), аутоиммунное заболевание щитовидной железы, аутоиммунную крапивницу, аксональные и нейрональные невропатии, болезнь Бало, болезнь Бехчета, буллезный пемфигоид, кардиомиопатию, болезнь Кастлемана, целиакию, болезнь Шагаса, синдром хронической усталости**, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию (ХВДП), хронический рецидивирующий мультифокальный остомиелит (ХРМО), синдром Чурга-Стросса, цикатрициальный пемфигоид/доброкачественный пемфигоид слизистых оболочек, болезнь Крона, синдром Коганса, холодовую агглютининовую болезнь, врожденную блокаду сердца, миокардит Коксаки, болезнь CREST, эссенциальную смешанную криоглобулинемию, демиелинизирующие невропатии, герпетиформный дерматит, дерматомиозит, болезнь Девича (нейромиелит оптический), дискоидную волчанку, синдром Дресслера, эндометриоз, эозинофильный эзофагит, эозинофильный фасциит, узловатую эритему, экспериментальный аллергический энцефаломиелит, синдром Эванса, фибромиалгию**, фиброзирующий альвеолит, гигантоклеточный артериит (височный артериит), гигантоклеточный миокардит, гломерулонефрит, синдром Гудпасчера, гранулематоз с полиангиитом (ГПА) (ранее называвшийся гранулематозом Вегенера), болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, энцефалит Хашимото, тиреоидит Хашимото, гемолитическую анемию, пурпуру Хеноха-Шонлейна, герпесную гестацию, гипогаммаглобулинемию, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), IgA-нефропатию, IgG4-связанную склерозирующую болезнь, иммунорегуляторные липопротеины, миозит с включениями, интерстициальный цистит, ювенильный артрит, ювенильный диабет (диабет 1 типа), ювенильный миозит, синдром Кавасаки, синдром Ламберта-Итона, лейкоцитокластический васкулит, планарный лишай, склерозный лишай, лигнойный конъюнктивит, линейную IgA-болезнь (ЛАБ), волчанку (СЭВ), болезнь Лайма, хроническую болезнь Меньера, микроскопический полиангиит, смешанное заболевание соединительной ткани (СЗСТ), язву Мурена, болезнь Мухи-Габермана, рассеянный склероз, миастению гравис, миозит,

нарколепсию, оптический нейромиелит (болезнь Девича), нейтропению, глазной рубцовый пемфигоид, неврит зрительного нерва, палиндромный ревматизм, ПАНРАС (педиатрические аутоиммунные нейропсихиатрические расстройства, ассоциированные со стрептококками), паранеопластическую мозжечковую дегенерацию, пароксизмальную ночную гемоглобинурию (ПНГ), синдром Парри-Ромберга, синдром Парсоннажа-Тернера, парспланит (периферический увеит), пемфигус, периферическую нейропатию, перивенозный энцефаломиелит, язвенную анемию, синдром POEMS, нодозный полиартериит, аутоиммунные полигландулярные синдромы типов I, II и III, ревматическую полимиалгию, полимиозит, постмиокардиальный инфарктный синдром, постперикардиотомический синдром, прогестероновый дерматит, первичный билиарный цирроз, первичный склерозирующий холангит, псориаз, псориатический артрит, идиопатический легочный фиброз, гангренозную пиодермию, чистую эритроцитарную аплазию, феномен Рейно, реактивный артрит, рефлекторную симпатическую дистрофию, синдром Рейтера, рецидивирующий полихондрит, синдром беспокойных ног, ретроперитонеальный фиброз, ревматическую лихорадку, ревматоидный артрит, саркоидоз, синдром Шмидта, склерит, склеродермию, синдром Сьогрена, аутоиммунитет сперматозоидов и яичек, синдром мышечной скованности, подострый бактериальный эндокардит (ПБЭ), синдром Сусака, симпатическую офтальмию, артериит Такаясу, височный артериит/гигантоклеточный артериит, тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП), синдром Толозы-Ханта, поперечный миелит, язвенный колит, недифференцированное заболевание соединительной ткани (НЗСТ), увеит, васкулит, везикулобуллезный дерматоз, витилиго и гранулематоз Вегенера (теперь называется гранулематоз с полиангиитом (ГПА).

[0558] Различные заболевания почек можно лечить с помощью фармацевтических композиций, биоциклов CA2, компонентов биоциклов CA2, эффекторных модулей CA2, включая их SRE, или полезных нагрузок по настоящему изобретению.

[0559] Различные сердечно-сосудистые заболевания можно лечить с помощью фармацевтических композиций, биоциклов CA2, компонентов биоциклов CA2, эффекторных модулей CA2, включая их SRE, или полезных нагрузок по настоящему изобретению. В качестве неограничивающего примера, сердечно-сосудистым заболеванием может быть ишемическая болезнь сердца, также известная как ишемическая болезнь сердца, цереброваскулярная болезнь (инсульт), болезнь периферических сосудов, сердечная недостаточность, ревматическая болезнь сердца и врожденный порок сердца.

[0560] Различные дефициты антител можно лечить с помощью фармацевтических композиций, биоциклов CA2, компонентов биоциклов CA2, эффекторных модулей CA2, включая их SRE, или полезных нагрузок по настоящему изобретению. В качестве неограничивающего примера, дефицит антител может представлять собой X-сцепленную агаммаглобулинемию (XCA), аутосомно-рецессивную агаммаглобулинемию (APA), общий вариабельный иммунодефицит (ОВИД), дефицит подкласса IgG (IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), селективный дефицит IgA, дефицит специфических антител (ДСА), транзиторную гипогаммаглобулинемию младенческого возраста, дефицит антител при нормальном или повышенном уровне иммуноглобулинов, селективный дефицит IgM, иммунодефицит с тимомой (синдром Гуда), дефицит транскобаламина II, бородавки, гипогаммаглобулинемию, инфекцию, синдром миелокатексиса (БГИМ), дефицит антител, вызванный лекарствами, дефицит каппа-цепи, дефицит тяжелой цепи, нарушение постмейотической сегрегации (ПМС2) и неуточненную гипогаммаглобулинемию.

[0561] Различные глазные заболевания можно лечить с помощью фармацевтических композиций, биоциклов CA2, компонентов биоциклов CA2, эффекторных модулей CA2, включая их SRE, или полезных нагрузок по настоящему изобретению. В качестве неограничивающего примера, глазное заболевание может быть заболеванием щитовидной железы (ЗЩЗ), болезнь Грейвса (БГ) и орбитопатию, дегенерацию сетчатки, катаракту, атрофию зрительного нерва, макулярную дегенерацию, врожденный амавроз Лебера, дегенерацию сетчатки глаза, конусно-бронхиальную дистрофию, синдром Ашера, синдром «леопард», фотофобию и фотоаверсию.

[0562] Различные неврологические заболевания можно лечить с помощью фармацевтических композиций, биоциклов CA2, компонентов биоциклов CA2, эффекторных модулей CA2, включая их SRE, или полезных нагрузок по настоящему изобретению.

[0563] Различные психологические расстройства можно лечить с помощью фармацевтических композиций, биоциклов CA2, компонентов биоциклов CA2, эффекторных модулей CA2, включая их SRE, или полезных нагрузок по настоящему изобретению.

[0564] Различные заболевания легких можно лечить с помощью фармацевтических композиций, биоциклов CA2, компонентов биоциклов CA2, эффекторных модулей CA2, включая их SRE, или полезных нагрузок по настоящему изобретению. В качестве неограничивающего примера, заболевания легких могут представлять собой асбестоз, астму, бронхоэктазы, бронхит, хронический кашель, хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), круп, муковисцидоз, хантавирус, идиопатический легочный фиброз, коклюш, плеврит, пневмонию, легочную эмболию, легочную гипертензию, саркоидоз, апноэ сна, спирометрию, синдром внезапной детской смерти (СВДС), туберкулез, синдром Алагиля, аутоиммунный гепатит, билиарную атрезию, цирроз, ЭРХПГ (эндоскопическая ретроградная холангиопанкреатография) и гемохроматоз. Неалкогольный стеатогепатит, порфирия, первичный билиарный цирроз, первичный склерозирующий холангит.

[0565] Различные заболевания костей можно лечить с помощью фармацевтических композиций, биоциклов CA2, компонентов биоциклов CA2, эффекторных модулей CA2, включая их SRE, или полезных нагрузок по настоящему изобретению. В качестве неограничивающего примера, заболеваниями костей могут представлять собой остеопороз, нейрофиброматоз, несовершенный остеогенез (НО), рахит, остеосаркому, ахондроплазию, перелом, остеомиелит, опухоль Юинга костей, остеомаляцию, дисплазию тазобедренного сустава, болезнь костей Пэджета, мраморную болезнь костей, остеохондрому, рак кости, заболевание костей, остеохондроз, остеому, фиброзную дисплазию, клидокраниальный дизостоз, остеокластому, костную кисту, метаболическое заболевание костей, мелореостоз, мозоль, синдром Каффи и мандибулофациальный дизостоз.

[0566] Различные заболевания крови можно лечить с помощью фармацевтических композиций, биоциклов CA2, компонентов биоциклов CA2, эффекторных модулей CA2, включая их SRE, или полезных нагрузок по настоящему изобретению. В качестве неограничивающего примера, заболевания крови могут представлять собой анемию и ХБП (для специалистов здравоохранения), апластическую анемию и миелодиспластические синдромы, тромбоз глубоких вен, гемохроматоз, гемофилию, пурпуру Хеноха-Шенлейна, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, железодефицитную анемию, пернициозную анемию, легочную эмболию, серповидно-клеточную анемию, серповидно-клеточную аномалию и другие

гемоглобинопатии, талассемию, тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру и заболевание фон Виллебранда.

Центральная нервная система (ЦНС)

[0567] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, биоциклы CA2, компоненты биоциклов CA2, эффекторные модули CA2, включая их SRE, или полезные нагрузки по настоящему изобретению могут быть использованы для модуляции, изменения или эксплуатации белков центральной нервной системы, включая белки спинномозговой жидкости (СМЖ).

[0568] В некоторых примерах фармацевтические композиции, биоциклы CA2, компоненты биоциклов CA2, эффекторные модули CA2, включая их SRE, или полезные нагрузки по настоящему изобретению могут быть использованы для предоставления настраиваемых продуктов ЗФТ (заместительной ферментной терапии) в центральную нервную систему. Многие лизосомные болезни накопления (ЛБН) сопровождаются симптомами со стороны ЦНС, такими как умственная отсталость, судороги, глубокая нейродегенерация, поведенческие аномалии и психомоторные дефекты. ЗФТ для ЛБН является одной из настоящих историй успеха в современной молекулярной медицине. Успешное применение ЗФТ зависит от контролируемых лизосомных белков (например, ферментов) и их доставки в клетки ЦНС.

[0569] В некоторых примерах фармацевтические композиции, биоциклы CA2, компоненты биоциклов CA2, эффекторные модули CA2, включая их SRE, или полезные нагрузки по настоящему изобретению могут быть использованы для локального получения моноклональных антител против белковых агрегатов в ЦНС и ЦСЖ. Такие антитела могут быть использованы для лечения дегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера (БА), болезнь Хантингтона (БХ) и болезнь Паркинсона (БП).

[0570] В других примерах фармацевтические композиции, биоциклы CA2, компоненты биоциклов CA2, эффекторные модули CA2, включая их SRE, или полезные нагрузки по настоящему изобретению могут быть использованы для регулирования нейротрофических факторов в центральной нервной системе.

Редактирование генов

[0571] Системы CRISPR-Cas9 были разработаны и модифицированы для использования в генетическом редактировании и оказались высокоэффективной и специфичной технологией для редактирования последовательности нуклеиновых кислот даже в эукариотических клетках. Многие исследователи описали различные модификации бактериальных CRISPR-Cas систем и продемонстрировали, что CRISPR-Cas системы могут быть использованы для манипулирования нуклеиновой кислотой в клетке, например, в клетке млекопитающего и в клетке растения. Репрезентативные ссылки включают патенты США № 8993233; 8999641; 8945839; 8932814; 8906616; 8895308; 8889418; 8889356; 8871445; 8865406; 8771945; и 8697359; патентные публикации США № 20150031134; 20150203872; 20150218253; 20150176013; 20150191744; 20150071889; 20150067922; и 20150167000; каждый документ включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0572] Однако контроль эффектов и активности системы CRISPR-Cas (например, направляющей РНК и нуклеазы) является сложной задачей и часто может быть проблематичным.

[0573] Биоциклы CA2 по настоящему изобретению и/или любые из их компонентов могут быть использованы для регулирования или настройки системы CRISPR/Cas9 с целью оптимизации ее полезности.

[0574] Примеры настройки системы показаны на Фиг. 19A и ФИГ. 19B международной публикации № WO 2017/180587 (содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[0575] В некоторых вариантах осуществления полезные нагрузки эффекторных модулей CA2 по изобретению могут включать альтернативные изоформы или ортологи фермента Cas9.

[0576] Наиболее часто используемый Cas9 получен из *Streptococcus pyogenes*, домен RuvC может быть инактивирован мутацией D10A, а домен HNH может быть инактивирован мутацией H840A.

[0577] В дополнение к Cas9, полученному из *S. pyogenes*, другие РНК-направляемые эндонуклеазы (RGEN) также могут быть использованы для программируемого редактирования генома. Последовательности Cas9 были идентифицированы в более чем 600 бактериальных штаммах. Хотя семейство Cas9 демонстрирует большое разнообразие аминокислотных последовательностей и размеров белков, все белки Cas9 имеют общую архитектуру с центральным нуклеазным доменом HNH и расщепленным H-доменом RuvC/RHase.

[0578] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка по настоящему изобретению может представлять собой расщепленный Cas-9 (Zetsche B et al. A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. Nat Biotechnol. 2015 Feb;33(2):139-42; содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме).

[0579] В дополнение к ортологам Cas9, другие варианты Cas9, такие как слитые белки неактивного dCas9 и эффекторных доменов с различными функциями, могут служить платформой для генетического модулирования. Любой из вышеперечисленных ферментов может быть применим в настоящем изобретении.

[0580] Биоциклы CA2 на основе CRISPR/Cas9 могут быть созданы любым из методов, описанных в международной публикации № WO 2016106244 и Gao Y et al. Complex transcriptional modulation with orthogonal and inducible dCas9 regulators. Nat Methods. 2016 Dec;13(12):1043-1049; содержание каждого из которых включено в настоящий документ путем ссылки во всей своей полноте).

[0581] Система CRISPR/Cas9 также может быть использована для модуляции экспрессии генов, что может сочетаться с ее пригодностью для редактирования генов. В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка эффекторных модулей CA2 по изобретению может включать связанные с CRISPR транскрипционные активаторы, например, VP64-p65-Rta (VPR), или репрессоры, например Kruppel-ассоциированный бокс (KRAB), связанный с системой CRISPR/Cas9.

Применение стволовых клеток

[0582] Биоциклы CA2 по настоящему изобретению и/или любые из их компонентов могут быть использованы в регулируемом перепрограммировании клеток, приживлении стволовых клеток или в других областях, где применимы контролируемая или настраиваемая экспрессия таких факторов перепрограммирования.

[0583] Биоциклы CA2 по настоящему изобретению могут быть использованы для перепрограммирования клеток, включая стволовые клетки или индуцированные стволовые клетки. Индукция индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) впервые была достигнута Takahashi и Yamanaka (*Cell*, 2006. 126(4):663-76; включена в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте) путем использования вирусных векторов для экспрессии KLF4, c-MYC, OCT4 и SOX2, иначе совместно известных как KMOS.

[0584] Эффекторные модули CA2 по настоящему изобретению могут включать полезную нагрузку, включающую любой из генов, включая, помимо прочего, OCT, такой как OCT4, SOX, такой как SOX1, SOX2, SOX3, SOX15 и SOX18, NANOG, KLF, такой как KLF1, KLF2, KLF4 и KLF5, MYC, такой как c-MYC и n-MYC, REM2, TERT и LIN28 и их варианты в поддержку перепрограммирования клеток. Последовательности таких факторов перепрограммирования описаны, например, в международной заявке PCT/US2013/074560, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0585] Эффекторные модули CA2 по настоящему изобретению могут включать полезную нагрузку, включающую любой из факторов, способствующих мобилизации стволовых клеток. При аутологичной терапии стволовыми клетками источниками стволовых клеток для трансплантации могут быть костный мозг, мононуклеарные клетки периферической крови и пуповинная кровь. Стволовые клетки стимулируются из этих источников (например, костного мозга) в кровоток. Таким образом, достаточное количество стволовых клеток доступно для отбора для будущей реинфузии. Для мобилизации стволовых клеток можно использовать одну стратегию цитокинов или их комбинацию, включая, помимо прочего, G-CSF (филграстим), GM-CSF и химиотерапию, предшествующую цитокинам (химиомобилизация).

Метаболические пептиды и гормоны

[0586] В некоторых вариантах осуществления биоциклы CA2 по настоящему изобретению и/или любой из их компонентов могут быть использованы для регуляции пептидов, природных или синтетических. Пептиды природного происхождения могут включать, помимо прочего, пептидные гормоны, натрийуретические пептиды, пищевые пептиды, а также производные и предшественники.

[0587] Биоциклы CA2 по настоящему изобретению и/или любые их компоненты также могут быть использованы для пульсирующего высвобождения гормонов или других пептидных препаратов.

Ферментозаместительная терапия (ФЗТ)

[0588] Ферментозаместительная терапия (ФЗТ) - это медицинская процедура, заменяющая фермент в организме пациента. ФЗТ обеспечивает терапевтическое вмешательство, направленное на устранение основного метаболического дефекта при многих заболеваниях, вызванных дефектными ферментами. Такие нарушения включают лизосомальные болезни накопления (ЛБН), врожденные нарушения гликозилирования и метаболические нарушения, характеризующиеся отсутствием или снижением активности ферментов в цитоплазме, но не ограничиваются ими.

[0589] В некоторых вариантах осуществления биоциклы CA2 по настоящему изобретению и/или любой из их компонентов также могут быть использованы для регулирования ферментативной активности во время ФЗТ. В качестве неограничивающего примера, полезная нагрузка биоциклов CA2 по настоящему изобретению может представлять собой функциональный лизосомальный фермент для ФЗТ, такой как a-D-маннозидаза, N-аспартил-β-глюкозаминидаза, кислая липаза; гексозаминидаза A, a-галактозидаза A, β-галактозидаза, лизосомальная протеаза, церамидаза, фукозидаза; β-глюкозидаза, N-ацетилглюкозамин-1–фосфотрансфераза, сульфатаза, гиалуронидаза, галактоцереброзидаза; арилсульфатаза A; N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансфераза; a-L-идуронидаза; идуронатсульфатаза; гепарансульфамидаза; N-ацетилглюкозаминидаза; ацетил-CoA:a-глюкозаминидацетилтрансфераза; N-ацетилглюкозамин 6-сульфатаза; N-ацетилгалактозамин-6-сульфатсульфатаза; N-ацетилгалактозамин-4-сульфатаза; β-глюкуронидаза; гиалуронидаза; сиалидаза; сульфатаза; сфингомиелиназа; кислая a-глюкозидаза; β-

маннозидаза; катепсин K; β-гексозаминидаза A; β-гексозаминидаза B, a-N-ацетилгалактозаминидаза, сиалин и гексозаминидаза.

Коагуляция

[0590] Дефекты коагуляции часто вызывают кровотечение и/или тромбоз. Наиболее известными нарушениями факторов свертывания крови являются гемофилии. Три основные формы представляют собой гемофилию A (дефицит фактора VIII), гемофилию B (дефицит фактора IX или «болезнь Кристмаса») и гемофилию C (дефицит фактора XI, легкая склонность к кровотечениям). Другие заболевания, вызванные дефектными факторами свертывания крови, также включают, помимо прочего, болезнь фон Виллебранда (вызванную дефектом фактора фон Виллебранда (vWF), синдром Бернара-Сулье (вызванный дефектом или дефицитом GPIb, рецептора vWF), тромбофлебит (вызванный мутациями в факторе XII), врожденную афибриногенемию, наследственный почечный амилоидоз (вызванный мутациями в факторе I), врожденный дефицит проконвертина/фактора VII, тромбофилию (вызванную дефицитом фактора II), врожденный дефицит фактора X, врожденный дефицит фактора XIIIa/b, дефицит прекалликреина/фактора Флетчера, дефицит кининогена, гломерулопатию с отложениями фибронектина, дефицит кофактора гепарина II, дефицит белка C, дефицит белка S, дефицит белка Z, дефицит антитромбина III, дефицит плазминогена, тип I (лигнойный конъюнктивит), дефицит антиплазмина, дефицит ингибитора активатора плазминогена-1 и нарушение тромбоцитов Квебека.

[0591] Генная терапия для замены факторов коагуляции - это медицинский метод лечения заболеваний, вызванных дефицитом коагуляции. В соответствии с настоящим изобретением, биоциклы CA2 по настоящему изобретению и/или любой из их компонентов также могут быть использованы для регулирования фактора коагуляции, используемого для генной терапии. В некоторых примерах фактор коагуляции может быть выбран из фактора I (фибриноген), фактора II (протромбин), фактора III (тканевой фактор), фактора IV, фактора V (проакцелерин), фактора VI, фактора VII (стабильный фактор), фактора VIII (антигемофильный фактор A), фактора IX (антигемофильный фактор B), фактора X (фактор Стюарта-Прауэра), фактора XI (предшественник плазменного тромбопластина), фактора XII (фактор Хагемана), фактора XIII (фибрин-стабилизирующий фактор), фактора фон Виллебранда, прекалликреина (фактор Флетчера), высокомолекулярного кининогена (ВМВК) (фактор Фицджеральда), фибронектина, антитромбина III, кофактора гепарина II, белка C, белка S, белка Z, ингибитор протеазы, связанной с белком Z (ZPI), плазминогена, тканевого активатора плазминогена (tPA), урокиазы, плазминогена, ингибитора активатора плазминогена 1 (PAI1) и ингибитора активатора плазминогена 2 (PAI2)

[0592] В одном варианте осуществления фактор коагуляции представляет собой фактор VIII для генной терапии гемофилии, включая фактор VIII дикого типа, сконструированный фактор VIII, активированный fVIII (fVIIIa) или эквивалент. Типичный сконструированный фактор VIII может включать факторы, обсуждаемые Roberts et al (*J. Genet. Syndr. Gene Ther.*, 2011, 1: S1-006; содержание которой полностью включено в настоящий документ путем ссылки).

[0593]

Стратификация пациентов

[0594] В одном варианте осуществления пациенты также могут быть стратифицированы в соответствии с иммуногенными пептидами, представленными их иммунными клетками, и могут быть использованы в

качестве параметра для определения подходящих когорт пациентов, которые могут получить терапевтическую пользу от композиций по изобретению.

Микробиом

[0595] Биоциклы CA2 по настоящему изобретению и/или любые из их компонентов могут быть использованы для регулирования или настройки микробиома. Разнообразное сообщество симбиотических, комменсальных и патогенных микроорганизмов существует во всех местах организма, подверженных воздействию окружающей среды, и в настоящем документе называется «Микробиомом». Участки тела, подверженные воздействию окружающей среды, которые могут быть заселены микробиомом, включают кожу, носоглотку, ротовую полость, дыхательные пути, желудочно-кишечный тракт и репродуктивный тракт. Тесная связь микробиома с организмом оказывает глубокое влияние на здоровье и болезни человека, включая астму, воспалительные заболевания кишечника, метаболические, сердечно-сосудистые и онкологические заболевания. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления биоциклы CA2, компоненты биоциклов CA2, эффекторные модули CA2, включая их SRE, или полезные нагрузки по настоящему изобретению могут быть использованы в модуляции, изменении или эксплуатации микробиома и/или микроокружения микробиома.

[0596] В некоторых вариантах осуществления микробиом может быть сконструирован с помощью биоциклов CA2, состоящих из немикробных биомолекул в качестве полезной нагрузки. Неограничивающие примеры полезной нагрузки включают противовирусный пептид, ферменты, нейропептиды, цитокины и другие растворимые факторы. Такие стратегии превращают микробиом в терапевтические агенты для лечения заболеваний. В качестве неограничивающего примера в качестве полезной нагрузки может быть использован глюкагонподобный пептид-1. Введение *Lactobacillus gasseri*, созданного для экспрессии глюкагонподобного пептида-1, индуцировало выработку инсулина в организме хозяина и уменьшало гипергликемию (Duan, F., et al., Diabetes, 64, 1794-1803 (2015); содержание которого включено в настоящий документ в полном объеме).

[0597] В некоторых вариантах осуществления микробиом может включать в себя переключатель уничтожения. Как используется в настоящем документе, термин « переключатель уничтожения» относится к биоциклам по настоящему изобретению, которые включают один или более токсинов в качестве полезной нагрузки. Микроорганизмы, сконструированные для введения *in vivo*, могут быть запрограммированы на уничтожение в определенное время, после доставки гена или генов и/или после того, как хозяин испытает терапевтический эффект. В частности, может быть полезно предотвратить длительную колонизацию хозяина организмами или распространение микроорганизмов за пределы интересующей области. Примеры токсинов, которые могут быть использованы в переключателях уничтожения, включают, помимо прочего, бактериоцины, лизины и другие молекулы, которые вызывают уничтожение клеток путем лизиса клеточных мембран, деградации клеточной ДНК или других механизмов.

Трансгенные организмы

[0598] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изображении предложены трансгенные организмы, которые экспрессируют нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды по настоящему изобретению. Как используется в настоящем документе термин «трансгенный организм» относится к любому существу, не являющемуся человеком, которое содержит искусственно перенесенный, экзогенный генетический материал. Этот подход обеспечивает возможность временного регулирования полезной

нагрузки в определенных клетках, тканях или во всем организме. Такие методы могут быть полезны при создании трансгенных моделей определенных заболеваний или для изучения эмбрионального развития.

[0599] Трансгенные организмы, описанные в настоящем документе, могут включать грызунов, рыб, рептилий, а также беспозвоночных. В предпочтительном варианте осуществления такие трансгенные организмы могут быть выбраны из семейства грызунов, включая мышь и крысу.

Настраиваемая регуляция

[0600] Биоциклы CA2 по настоящему изобретению и/или любой из их компонентов также могут быть использованы для регулирования экспрессии другого эффекторного модуля, например, рекомбинантной конструкции, включающей POI. В некоторых вариантах осуществления биоциклы CA2 и/или эффекторные модули CA2 могут включать протеазу (также называемую пептидазой или протеиназой). Настраиваемая протеаза может расщеплять неактивную конструкцию до активной, когда эти два компонента совместно вводятся в клетку, ткань или организм.

[0601] В других примерах биоциклы CA2 и/или эффекторные модули CA2, включающие протеазу, могут также использоваться для регулирования процессинга белка, включая расщепление исходного белкового продукта для получения более мелкого активного белка или пептида.

[0602] В некоторых вариантах осуществления биоциклы CA2 по настоящему изобретению и/или любой из их компонентов могут включать любой из факторов, играющих роль в процессинге и модификации белка. Посттрансляционная модификация белка может включать, помимо прочего, добавление гидрофобных групп ферментом (например, миристоилирование, пальмитоилирование, изопренилирование, пренилирование, фарнезилирование, геранилгеранилирование, глипизация, и гликозилфосфатидилинозитол (GPI)-якорь); присоединение кофакторов для усиления функции (например, липоилирование, флавинирование, фосфопантеинилирование и гем C); добавление низкомолекулярных химических групп (например, ацилирование, формилирование, алкилирование, фосфорилирование, метилирование, аргинилирование, полиглутамилирование, полиглицилирование, бутирилирование, гликозилирование, пропионилирование, S-глутатионилирование, S-нитрозилирование, S-сульфенилирование, сукцинилирование, сульфатирование и ацетилирование); связывание других белков и/или пептидов, например, ISG-илирование, SUMO-илирование, убиквитинирование, неаддилатация и пупилирование; химическая модификация аминокислот; и структурные изменения.

Булевые переключатели

[0603] Биоциклы CA2 по настоящему изобретению также могут быть включены в конструкцию клеточных булевых переключателей. Как используется в настоящем документе, булевый переключатель относится к циклу, который предназначен для выполнения логической операции на основе одного или более входов и который производит выход. Логические операции, выполняемые булевыми переключателями, не ограничиваются AND, OR, NOR, NAND, NOT, IMPLY, NIMPLY, XOR или XNOR. Гэйты OR и AND представляют собой наиболее фундаментальные логические операции, где OR представляет собой сценарий, в котором любой из одного или более входов необходим для получения выхода, а AND представляет собой сценарий, в котором все входы необходимы для получения выхода. Составные булевые переключатели, состоящие из нескольких логических операций, также могут быть получены с помощью биоциклов CA2 по изобретению. В некоторых вариантах осуществления биоциклы CA2 и/или любой из их компонентов могут

представлять один или более входов в булевом переключателе. В других вариантах осуществления биоциклы CA2 по изобретению могут быть объединены с переключателями, известными в данной области техники, для создания булевых переключателей. Выход булевых переключателей может зависеть от используемой полезной нагрузки. В качестве неограничивающего примера можно получить булевый переключатель на основе AND, где первый вход включает биоцикл CA2 с нуклеазой редактирования генов Cas9 в качестве полезной нагрузки, а второй вход включает биоцикл CA2 с активатором транскрипции VPR в качестве полезной нагрузки. В присутствии направляющей РНК гена-мишени для транскрипционной активации гена-мишени требуется добавление стимулов к обоим входам (Gao Y et al. (2016) Nat Methods.13(12):1043-1049; содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме).

Биофабрики

[0604] Биоциклы CA2 по настоящему изобретению и/или любые их компоненты могут быть использованы для регулирования уровня продукции белка на биофабрике. Как используется в настоящем документе, термин «биофабрика» относится к клетке, ткани, органу или организму, генетически модифицированному или нет, который может производить белки с рядом применений, включая терапевтические цели (ингибиторы, ферменты, антитела, антигены и т.д.) или первичные или вторичные продукты, представляющие промышленный интерес. В некоторых примерах клетка может быть прокариотической клеткой, эукариотической клеткой, клеткой млекопитающего, клеткой растения и т.д.

[0605] В некоторых вариантах осуществления биоциклы CA2 по настоящему изобретению могут быть использованы для регулирования лекарственных белков, вырабатываемых в целевой ткани, например, в печени и почках. Печень - это орган, который производит секретируемые белки, включая основные белки плазмы, факторы гемостаза и фибринолиза, белки-носители, гормоны, прогормоны и аполипопротеины, или различные короткоживущие метаболические пептиды и ферменты, которые обычно жестко регулируются, или другие непеченочные белки. В данном контексте печень выполняет роль фабрики экспрессии генов (биофабрики), поставляющей белок для лечения заболевания, например, метаболического заболевания.

[0606] В других вариантах осуществления биоциклы CA2 по настоящему изобретению могут быть использованы для регуляции белков для промышленных процессов.

Нацеливание на печень

[0607] Печень - это важный орган, который производит белки, участвует в свертывании крови и выполняет ряд метаболических функций. Разнообразные заболевания могут поражать печень, поэтому лечение заболеваний с помощью печени является многообещающим подходом, особенно нацеленная на печень генная терапия. Биоциклы CA2 по настоящему изобретению и/или любые их компоненты могут быть использованы для регулирования нацеленной на печень генной терапии и переноса генов.

[0608] Белки, которые могут быть нацелены на печень и сконструированы в настоящий биоциклы CA2 для регуляции, могут включать белки при раке печени, таком как гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК), фиброламеллярная ГЦК, холангиокарцинома, ангиосаркома и вторичный рак печени; наследственные заболевания, вызванные дефектными генами, например, гемохроматоз, болезнь Вильсона, тирозинемия, дефицит альфа-1-антитрипсина, болезнь накопления гликогена; метаболические нарушения из-за дефицита ферментов, например, синдром Жильбера, дефицит лизосомальной кислой липазы (ДЛКЛ) и болезнь Гоше; аутоиммунный гепатит; жировые заболевания печени; и вирусные гепатиты (A, B и C). В некоторых примерах

настоящие биоциклы CA2 могут быть использованы для направления IL12 для лечения гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) и IL10 для лечения диабетической нейропатии.

[0609] В некоторых вариантах осуществления настоящие биоциклы CA2 могут быть использованы для управления генными продуктами, специфичными для печени, в целях генной терапии.

[0610] В некоторых вариантах осуществления настоящие биоциклы CA2 могут быть использованы для управления секретируемыми (например, в кровь) белками печени.

Микрофлюидные устройства

[0611] В некоторых вариантах осуществления клетки, содержащие биоциклы CA2 по настоящему изобретению и/или любой из их компонентов, могут быть использованы в микрофлюидных устройствах. Как используется в настоящем документе « микрофлюидное устройство» относится к манипулированию пиколитровыми и нанолитровыми объемами жидкостей в искусственно созданных микросистемах. Микрофлюидные устройства, включающие биоциклы CA2 по настоящему изобретению, могут быть использованы для изучения моделей клеточных культур, клеточного микроокружения, клеточных секреций, хемотаксиса, апоптоза, сосудистой функции, роста клеток нейронов, эмбрионального развития, одноклеточной метаболомики, экспрессии генов, исследования лекарств, разделения клеток, биологии стволовых клеток, биореакторов, трехмерной культура клеток и тканевой инженерии.

Инструменты и агенты для создания терапевтических средств

[0612] В настоящем изобретении предложены инструменты и агенты, которые могут быть использованы для создания терапевтических средств, таких как, помимо прочего, иммунотерапевтические средства для уменьшения объема или опухолевой нагрузки у нуждающегося в этом субъекта. В процесс получения терапевтического агента вовлечено значительное количество переменных, таких как структура полезной нагрузки, тип клеток, метод переноса генов, метод и время размножения ex vivo, предварительное кондиционирование, а также количество и тип опухолевой нагрузки у субъекта. Такие параметры могут быть оптимизированы с помощью инструментов и средств, описанных в настоящем документе.

Клеточные линии

[0613] В настоящем изобретении предложена клетка млекопитающего, которая была генетически модифицирована с помощью композиций по изобретению. Подходящие клетки млекопитающего включают в себя первичные клетки и иммортализированные линии клеток. Подходящие линии клеток млекопитающих включают, помимо прочего, клеточную линию 293 эмбриональной почки человека, клеточную линию фибробластов NIH 3T3, клеточную линию колоректальной карциномы человека HCT116, клеточную линию карциномы яичника SKOV-3, иммортализованные Т-клеточные линии (например, клетки Jurkat и клетки SupT1), клеточную линию лимфомы Raji, клетки NALM-6, клетки K562, клетки HeLa, клетки PC12, клетки HL-60, NK-клеточные линии (например, NKL, NK92, NK962 и YTS), и тому подобное. В некоторых вариантах осуществления клетка не является иммортализованной клеточной линией, а представляет собой клетку, полученную от человека, и в данном случае называется первичной клеткой. Например, клетка представляет собой Т-лимфоцит, полученный от человека. Другие примеры включают, помимо прочего, цитотоксические клетки, стволовые клетки, мононуклеарные клетки периферической крови или клетки-предшественники, полученные от человека.

Отслеживание SRE, биоциклов и клеточных линий

[0614] В некоторых вариантах осуществления может быть желательно отслеживать композиции по изобретению или клетки, модифицированные композициями по изобретению. Отслеживание может быть достигнуто с помощью полезных нагрузок, таких как репортерные фрагменты, которые, как используется в настоящем документе, относятся к любому белку, способному создавать детектируемый сигнал в ответ на вход. Примеры включают щелочную фосфатазу, β-галактозидазу, хлорамфениколацетилтрансферазу, β-глюкуронидазу, пероксидазу, β-лактамазу, каталитические антитела, биолюминесцентные белки, например, люциферазу, и флуоресцентные белки, такие как зеленый флуоресцентный белок (GFP).

[0615] Репортерные фрагменты могут быть использованы для мониторинга ответа SRE при добавлении лиганда, соответствующего SRE. В других случаях репортерные фрагменты могут использоваться для отслеживания выживаемости, персистенции, роста клеток и/или их локализации *in vitro, in vivo или ex vivo.*

[0616] В некоторых вариантах осуществления предпочтительным репортерным фрагментами могут быть белки люциферазы.

Шапероны

[0617] В некоторых вариантах осуществления эффекторные модули CA2 по настоящему изобретению могут включать один или более шаперонов для регуляции экспрессии полезной нагрузки. Шапероны, применимые в настоящем изобретении, могут быть клеточными шаперонами или низкомолекулярными, называемыми фармакологическими шаперонами. Клеточные шапероны относятся к большой группе несвязанных семейств белков, роль которых заключается в стабилизации несвернутых белков-клиентов, или в разворачивании клиентских белков для транслокации через мембраны или для деградации, и/или в помощи в их правильном сворачивании и сборке. Шапероны также взаимодействуют с другими компонентами сети протеостаз, такими как система протеасом и аутофагия, чтобы способствовать очистке белков. Примеры семейств молекулярных шаперонов включают низкомолекулярные белки теплового шока, такие как hsp25; белки семейства белков теплового шока 60, такие как cpn60 и GroEL; белки семейства белков теплового шока 70, такие как DnaK и BiP; белки семейства белков теплового шока 90; белки семейства белков теплового шока 100, такие как ClP; лектин-шапероны, такие как кальнексин и кальретикулин и фолдинг-шапероны, такие как белоки-дисульфидизомеразы (PDI), пептидилпролил-цис-транс-изомераза (PPI) и ERp57. В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка по настоящему изобретению может быть клеточным шапероном. В отсутствие стимула, стабилизирующего SRE, клеточный шаперон может связываться с SRE и поэтому не может взаимодействовать со своими белками-клиентами. В присутствии стимула, специфичного для SRE, SRE стабилизируется, и шаперон становится доступным для взаимодействия с белками-клиентами. В некоторых вариантах осуществления полезные нагрузки по настоящему изобретения могут быть добавлены к шаперонам таким образом, что стабильность или нестабильность полезной нагрузки может быть повышена. В других вариантах осуществления, SRE по настоящему изобретению могут состоять из одного или более молекулярных шаперонов.

[0618] Шапероны, применимые в настоящем изобретении, могут также включать фармакологические шапероны, которые используют небольшие молекулы для облегчения правильного сворачивания и стабилизации клеточных белков. Мутации в клеточных белках могут привести к неправильному формированию белков и/или их агрегации, что в конечном итоге приводит к их деградации. Фармакологические шапероны были сконструированы для связывания с неправильно свернутыми целевыми

белками, облегчения их правильного сворачивания и, таким образом, предотвращения их деградации. В некоторых вариантах осуществления, SRE по настоящему изобретению могут включать один или более неправильно свернутых белков, а стимул, специфичный для SRE, может включать один или более фармакологических шаперонов таким образом, что эффекторный модуль CA2 стабилизируется только в присутствии фармакологического шаперона.

Животные модели

[0619] Полезность и эффективность композиций по настоящему изобретению может быть проверена на животных моделях *in vivo*, предпочтительно мышиных моделях. Используемые мышиные модели могут быть сингенными мышиными моделями, в которых мышиные клетки модифицируются композициями по изобретению и тестируются на мышах того же генетического фона. Примеры включают мышиные модели pMEL-1 и 4T1. В качестве альтернативы в таких исследованиях могут также использоваться ксенотрансплантатные модели, в которых клетки человека, такие как опухолевые клетки и иммунные клетки, вводят иммунодефицитным мышам. Используемые иммунодефицитные мыши могут быть CByJ.Cg-Foxn1nu/J, B6;129S7-Rag1tm1Mom/J, B6.129S7-Rag1tm1Mom/J, B6. CB17-Prkdcscid/SzJ, NOD.129S7(B6)-Rag1tm1Mom/J, NOD.Cg-Rag1tm1MomPrf1tm1Sdz/Sz, NOD.CB17-Prkdcscid/SzJ, NOD.Cg-PrkdcscidB2mtm1Unc/J, NOD-scid IL2Rgnull, голыми (ню) мышами, мышами SCID, мышами NOD, мышами RAG1/RAG2, мышами NOD-Scid, мышами IL2rgnull, мышами b2mnull, мышами NOD-scid IL2r□null, мышами NOD-scid-B2mnull, мышью с врожденным отсутствием естественных клеток-киллеров и HLA-трансгенным мышами.

Клеточные анализы

[0620] В некоторых вариантах осуществления эффективность композиций по изобретению в качестве иммунотерапевтических агентов может быть оценена с помощью клеточных анализов. Уровни экспрессии и/или идентичность композиций по изобретению могут быть определены в соответствии с любыми методами, известными в данной области для идентификации белков и/или количественного определения уровней белков. В некоторых вариантах осуществления такие методы могут включать вестерн-блоттинг, проточную цитометрию и иммуноанализы.

[0621] В настоящем документе предложены способы функциональной характеристики клеток, экспрессирующих SRE, биоциклы CA2 и композиции по изобретению. В некоторых вариантах осуществления функциональная характеристика проводится в первичных иммунных клетках или линиях иммунных клеток и может быть определена по экспрессии маркеров клеточной поверхности. Примеры маркеров клеточной поверхности для Т-клеток включают, помимо прочего, CD3, CD4, CD8, CD 14, CD20, CD11b, CD16, CD45 и HLA-DR, CD 69, CD28, CD44, ИФНгамма. Маркеры истощения Т-клеток включают PD1, TIM3, BTLA, CD160, 2B4, CD39 и LAG3. Примеры маркеров клеточной поверхности антигенпрезентирующих клеток включают, помимо прочего, MHC класса I, MHC класса II, CD40, CD45, B7-1, B7-2, рецептор ИФН γ и рецептор IL2, ICAM-1 и/или рецептор Fcγ. Примеры маркеров клеточной поверхности дендритных клеток включают, помимо прочего, MHC класса I, MHC класса II., B7-2, CD18, CD29, CD31, CD43, CD44, CD45, CD54, CD58, CD83, CD86, CMRF-44, CMRF-56, DCIR и/или дектин-1 и тому подобное; в то время как в некоторых случаях также наблюдается отсутствие CD2, CD3, CD4, CD8, CD14, CD15, CD16, CD 19, CD20, CD56 и/или CD57. Примеры маркеров клеточной поверхности для NK-клеток включают, помимо прочего, CCL3, CCL4, CCL5,

CCR4, CXCR4, CXCR3, NKG2D, CD71, CD69, CCR5, фосфо JAK/STAT, фосфо ERK, фосфо p38/ MAPK, фосфо AKT, фосфо STAT3, гранулизин, гранзим B, гранзим K, IL10, IL22, ИФНг, LAP, перфорин и TNFa.

Диагностирование

[0622] В некоторых вариантах осуществления scFvs, CAR и композиции по изобретению могут быть использованы в качестве диагностики. В некоторых случаях scFvs, CAR и/композиции по изобретению могут быть использованы для идентификации, маркировки или окрашивания клеток, тканей, органов и т.д. экспрессирующие целевые антигены. В дальнейших вариантах осуществления scFvs, CAR и/композиции по изобретению могут быть использованы для идентификации антигена CD19, присутствующего в срезах тканей (т.е. гистологических срезах тканей), включая ткани, известные или подозреваемые в наличии раковых клеток. Такие способы применения scFvs по изобретению в некоторых случаях могут быть использованы для идентификации раковых клеток или опухолей в срезах тканей. Участки ткани могут быть из любой ткани или органа, включая, помимо прочего, молочную железу, толстую кишку, поджелудочную железу, яичники, мозг, печень, почки, селезенку, легкие, кожу, желудок, кишечник, пищевод и кости. scFvs, CAR и/композиции по настоящему изобретению также могут быть использованы для идентификации образцов крови, подозрительных или известных как раковые, и отличия их от нормальной ткани.

Истощение Т-клеток

[0623] В некоторых вариантах осуществления биоциклы CA2, SRE или эффекторные модули CA2 могут быть использованы для предотвращения истощения Т-клеток. Как используется в настоящем документе, «истощение Т-клеток» относится к поэтапной и прогрессирующей потере функции Т-клеток, вызванной хронической активацией Т-клеток. Истощение Т-клеток является основным фактором, ограничивающим эффективность противовирусной и противоопухолевой иммунотерапии. Истощенные Т-клетки имеют низкую пролиферативную и цитокинопродуцирующую способность, одновременно с высокой скоростью апоптоза и высокой поверхностной экспрессией многочисленных ингибирующих рецепторов. Активация Т-клеток, приводящая к истощению, может происходить как в присутствии, так и в отсутствии антигена.

Клетки

[0624] В соответствии с настоящим изобретением предложены клетки, генетически модифицированные для экспрессии по меньшей мере одного биоцикла CA2, SRE (например, ДД CA2), эффекторного модуля CA2 и иммунотерапевтического агента по изобретению. Клетки по изобретению могут включать, без ограничения, иммунные клетки, стволовые клетки и опухолевые клетки. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки представляют собой эффекторные иммунные клетки, включая, помимо прочего, Т-клетки, такие как CD8+ Т-клетки и CD4+ Т-клетки (например, клетки Th1, Th2, Th17, Foxp3+), Т-клетки памяти, такие как стволовые Т-клетки памяти, центральные Т-клетки памяти и эффекторные Т-клетки памяти, терминально дифференцированные эффекторные Т-клетки, естественные клетки-киллеры (NK), NK Т-клетки, инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ), регуляторные Т-клетки (Treg) и дендритные клетки (ДК), другие иммунные клетки, способные вызывать эффекторную функцию, или их смесь. Т-клетки могут быть Tαβ-клетками и Tγδ-клетками. В некоторых вариантах осуществления стволовые клетки могут быть получены из эмбриональных стволовых клеток человека, мезенхимальных стволовых клеток и нейральных стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки могут быть истощены эндогенными рецепторами Т-клеток (см. патенты США № 9273283; 9181527 и 9028812; содержание каждого из которых включено в настоящий документ путем ссылки во всей своей полноте).

[0625] В некоторых вариантах осуществления клетки по изобретению могут быть аутологичными, аллогенными, сингенными или ксеногенными по отношению к конкретному субъекту.

[0626] В некоторых вариантах осуществления клетки по изобретению могут быть клетками млекопитающих, в частности, клетками человека. Клетки по изобретению могут быть первичными клетками или иммортализованными клеточными линиями.

[0627] В некоторых вариантах осуществления клетки по изобретению могут включать факторы размножения в качестве полезной нагрузки для запуска пролиферации и размножения клеток. Примерные полезные нагрузки включают членов суперсемейства RAS.

[0628] Сконструированные иммунные клетки могут быть получены путем трансдукции клеточной композиции с полипептидом биоцикла CA2, эффекторным модулем CA2, SRE и/или представляющей интерес полезной нагрузкой (например, иммунотерапевтическим агентом), или полинуклеотидом, кодирующим указанный полипептид, или вектором, включающим указанный полинуклеотид. Вектор может быть вирусным вектором, таким как лентивирусный вектор, гамма-ретровирусный вектор, рекомбинантный AAV, аденовирусный вектор и онколитический вирусный вектор. В других аспектах могут также использоваться невирусные векторы, например, наночастицы и липосомы. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки по изобретению генетически модифицированы для экспрессии по меньшей мере одного иммунотерапевтического агента по изобретению, который настраивается с помощью стимула. В некоторых примерах в клетку вводят два, три или более иммунотерапевтических агентов, сконструированных в одном и том же биоцикле CA2 и эффекторном модуле CA2. В других примерах в клетку могут быть введены два, три или более биоциклов CA2, эффекторных модулей CA2, каждый из которых включает иммунотерапевтический агент.

[0629] В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки по изобретению могут представлять собой Т-клетки, модифицированные для экспрессии антиген-специфического Т-клеточного рецептора (ТКР) или антиген-специфического химерного антигенного рецептора (CAR), описанного в настоящем документе (известные как CAR Т-клетки). Соответственно, по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий систему CAR (или ТКР), описанную в настоящем документе, или вектор, включающий полинуклеотид, вводят в Т-клетку. Т-клетка, экспрессирующая CAR или ТКР, связывается со специфическим антигеном посредством внеклеточного нацеливающего фрагмента CAR или ТРК, таким образом, сигнал через внутриклеточный сигнальный домен(ы) передается в Т-клетку, и в результате Т-клетка активируется. Активированная CAR Т-клетка изменяет свое поведение, включая высвобождение цитотоксического цитокина (например, фактора некроза опухоли, лимфотоксина и т.д.), повышение скорости пролиферации клетки, изменение молекулы клеточной поверхности или тому подобное. Такие изменения вызывают разрушение клетки-мишени, экспрессирующей антиген, распознаваемый CAR или ТКР. Кроме того, высвобождение цитокина или изменение молекулы клеточной поверхности стимулирует другие иммунные клетки, например, В-клетки, дендритные клетки, NK-клетки и макрофаги.

[0630] В некоторых вариантах осуществления CAR Т-клетки по изобретению могут быть дополнительно модифицированы для экспрессии еще одного, двух, трех или более иммунотерапевтических агентов. Иммунотерапевтические агенты могут представлять собой другой CAR или ТКР, специфичный к другой молекуле-мишени; цитокин, такой как IL2, IL12, IL15 и IL18; рецептор цитокина, такой как such as IL15Ra;

химерный переключающий рецептор, который преобразует ингибирующий сигнал в стимулирующий; хоминг-рецептор, который направляет адоптивно перенесенные клетки к целевому участку, например, к опухолевой ткани; агентом, оптимизирующим метаболизм иммунной клетки; или геном предохранительного выключателя (например, суицидальный ген), который уничтожает активированные Т-клетки, когда после адоптивного переноса клеток наблюдается тяжелое нежелательное явление или когда перенесенные иммунные клетки больше не нужны. Эти молекулы могут быть включены в один и тот же эффекторный модуль или в отдельные эффекторные модули.

[0631] В одном варианте осуществления CAR Т-клетки (включая ТКР Т-клетки) по изобретению могут представлять собой «бронированные» CAR Т-клетки, которые трансформированы с эффекторным модулем CA2, включающим CAR, и эффекторным модулем CA2, включающим цитокин. Индуцибельные или конститутивно секретируемые активные цитокины дополнительно бронируют CAR Т клетки для повышения эффективности и персистенции. В данном контексте такие CAR Т-клетки также называют «бронированными CAR Т-клетками». Молекула «брони» может быть выбрана на основе микроокружения опухоли и других элементов врожденной и адаптивной иммунных систем. В некоторых вариантах осуществления молекула может быть стимулирующим фактором, таким как IL2, IL12, IL15, IL18, ИФН типа I, CD40L и 4-1BBL, которые, как было показано, дополнительно повышают эффективность CAR Т-клеток и их персистенцию в условиях враждебного микроокружения опухоли посредством различных механизмов (Yeku et al., Biochem Soc Trans., 2016, 44(2): 412-418).

[0632] В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки по изобретению могут представлять собой NK-клетки, модифицированные для экспрессии антиген-специфического Т-клеточного рецептора (ТКР) или антиген-специфического химерного антигенного рецептора (CAR), описанного в настоящем документе.

[0633] NK-клетки могут быть выделены из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) или получены из эмбриональных стволовых (ЭС) клеток человека и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). Первичные NK-клетки, выделенные из МКПК, могут быть в дальнейшем размножены для адоптивной иммунотерапии. Стратегии и протоколы, применимые для размножения NK-клеток, могут включать стимуляцию интерлейкином 2 (IL2) и использование аутологичных питательных клеток или генетически модифицированных аллогенных питательных клеток. В некоторых аспектах NK-клетки могут быть селективно размножены с помощью комбинации стимулирующих лигандов, включая IL15, IL21, IL2, 41BBL, IL12, IL18, MICA, 2B4, LFA-1 и BCM1/SLAMF2 (например, патентная публикация США № US 20150190471).

[0634] Иммунные клетки, экспрессирующие эффекторные модули CA2, включающие CAR и/или другие иммунотерапевтические агенты, могут быть использованы в качестве иммунотерапии рака. Иммунотерапия включает клетки, экспрессирующие CAR и/или другие иммунотерапевтические агенты в качестве активного ингредиента, и может дополнительно включать подходящий эксципиент. Примеры эксципиента могут включать вышеупомянутые фармацевтически приемлемые эксципиенты, включая различные среды для клеточных культур, и изотонический хлорид натрия.

[0635] В некоторых вариантах осуществления клетки по настоящему изобретению могут представлять собой дендритные клетки, генетически модифицированные для экспрессии композиций по изобретению. Такие клетки могут быть использованы в качестве противораковых вакцин.

V. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0636] В различных местах настоящего описания признаки или функции композиций по настоящему изобретению описаны в группах или диапазонах. В частности подразумевается, что настоящее изобретение включает все и каждую отдельную подкомбинацию членов таких групп и диапазонов. Ниже приведен не ограничивающий перечень определений терминов.

[0637] *Активность:* Как используется в настоящем документе, термин «активность» означает состояние, в котором что-то происходит или делается. Композиции по изобретению могут обладать активностью, и эта активность может включать одно или более биологических явлений. В некоторых вариантах осуществления биологическое явление могут включать явления передачи сигналов клетки. В некоторых вариантах осуществления биологические явления могут включать явления передачи сигналов клетки, связанные с взаимодействием белка с одним или более соответствующими белками, рецепторами, низкомолекулярными веществами или любым из компонентов биоцикла, описанных в настоящем документе.

[0638] *Адоптивная клеточная терапия (АКТ):* Термины «адоптивная клеточная терапия» или «адоптивный перенос клеток», используемые в настоящем документе, относятся к клеточной терапии, включающей перенос клеток пациенту, при этом клетки могут быть получены от пациента или от другого человека и подвергаться конструированию (изменению) перед переносом обратно пациенту. Терапевтические клетки могут быть получены из иммунной системы, например, эффекторные иммунные клетки: CD4+ Т-клетки; CD8+ Т-клетки, естественные клетки-киллеры (NK-клетки); и В-клетки и инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), полученные из резецированных опухолей. Чаще всего переносимые клетки - это аутологичные противоопухолевые Т-клетки после размножения или манипуляций *ex vivo*. Например, аутологичные лимфоциты периферической крови могут быть генетически модифицированы для распознавания специфических опухолевых антигенов путем экспрессии Т-клеточных рецепторов (ТКР) или химерных антигенных рецепторов (CAR).

[0639] *Агент:* Как используется в настоящем документе, термин «агент» относится к биологическому, фармацевтическому или химическому соединению. Неограничивающие примеры включают простую или сложную органическую или неорганическую молекулу, пептид, белок, олигонуклеотид, антитело, производное антитела, фрагмент антитела, рецептор и растворимый фактор.

[0640] *Агонист*: термин «агонист», используемый в настоящем документе, относится к соединению, которое в комбинации с рецептором может вызвать клеточный ответ. Агонист может быть лигандом, который непосредственно связывается с рецептором. Альтернативно, агонист может соединяться с рецептором косвенно, например, путем (а) образования комплекса с другой молекулой, которая непосредственно связывается с рецептором, или (б) иным образом приводя к модификации другого соединения таким образом, что другое соединение непосредственно связывается с рецептором. Агонист может называться агонистом конкретного рецептора или семейства рецепторов, например, агонистом костимулирующего рецептора.

[0641] *Антагонист*: термин «антагонист», используемый в настоящем документе, относится к любому агенту, который ингибирует или снижает биологическую активность мишени (мишеней), которую он связывает.

[0642] *Антиген*: термин «антиген», используемый в настоящем документе, определяется как молекула, которая провоцирует иммунный ответ, когда она вводится субъекту или вырабатывается субъектом, например, опухолевые антигены, возникающие при развитии рака. Этот иммунный ответ может включать либо выработку антител, либо активацию специфических иммунологически компетентных клеток, таких как цитотоксические Т-лимфоциты и Т-хелперные клетки, либо и то, и другое. Антиген может быть получен из организмов, субъединиц белков/антигенов, убитых или инактивированных целых клеток или лизатов. В контексте изобретению, термины «представляющие интерес антигены» или «предпочтительные антигены» относятся к тем белкам и/или другим биомолекулам, представленным в настоящем документе, которые иммуноспецифически связаны или взаимодействуют с антителами по настоящему изобретению и/или их фрагментами, мутантами, вариантами и/или изменениями, описанными в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес антигены могут включать любой из полипептидов или полезных нагрузок или белков, описанных в настоящем документе, или их фрагменты или части.

[0643] *Приблизительно:* При использовании по тексту данного документа, термины «приблизительно» или «около» применительно к одному или более значениям, представляющим интерес, относятся к значению, которое аналогично установленному эталонному значению. В некоторых вариантах осуществления термин «приблизительно» или «около» относится к диапазону значений, которые попадают в пределы 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или менее в любую сторону (больше или меньше) от установленного эталонного значения, если не указано иное или иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число превышало бы 100 от возможного значения).

[0644] *Связан с:* Используемый в данном документе термины «связанный с», «конъюгированный», «связанный», «прикрепленный» и «присоединенный» при использовании в отношении двух или более фрагментов означают, что фрагменты физически соединены или связаны друг с другом, или напрямую, или через один или более дополнительных фрагментов, которые служат связующими агентами, с образованием структуры, которая является достаточно стабильной, так что фрагменты остаются физически связанными в условиях, в которых используется структура, например, в физиологических условиях. «Связывание» не обязательно должно осуществляться строго через прямую ковалентную химическую связь. Это может также предполагать ионную или водородную связь, или связь на основе гибридизации, достаточно стабильную, чтобы «связанные» структурные единицы оставались физически связанными.

[0645] *Аутологичный*: термин «аутологичный», используемый в настоящем документе, означает любой материал, полученный от того же человека, которому он впоследствии будет повторно введен.

[0646] *Штрих-код*: термин «штрих-код», используемый в настоящем документе, относится к полинуклеотидной или аминокислотной последовательности, которая отличает один полинуклеотид или аминокислоту от другого.

[0647] *Рак*: термин «рак», используемый в настоящем документе, относится к широкой группе различных заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом аномальных клеток в организме. Нерегулируемое деление и рост клеток приводит к образованию злокачественных опухолей, которые

захватывают соседние ткани и в конечном итоге метастазируют в отдаленные части тела через лимфатическую систему или кровоток.

[0648] *Костимулирующая молекула:* Как используется в настоящем документе, в соответствии с его значением в активации иммунных Т-клеток, относится к группе поверхностных рецепторов/лигандов иммунных клеток, которые взаимодействуют между Т-клетками и АПК и генерируют стимулирующий сигнал в Т-клетках, который сочетается со стимулирующим сигналом в Т-клетках, возникающим в результате распознавания Т-клеточным рецептором (ТКР) комплекса антиген/ГКГС (пГКГС) на АПК.

[0649] *Цитокины*: термин «цитокины», используемый в настоящем документе, относится к семейству низкомолекулярных растворимых факторов с плейотропными функциями, которые вырабатываются многими типами клеток и могут влиять на и регулировать функцию иммунной системы.

[0650] *Доставка*: термин «доставка», используемый в настоящем документе, относится к действию или способу доставки соединения, вещества, структурной единицы, фрагмента, нагрузки или полезной нагрузки. «Агент доставки» относится к любому агенту, который облегчает, по крайней мере частично, доставку in vivo одного или более веществ (включая, помимо прочего, соединение и/или композицию по настоящему изобретению) в клетку, субъекту или другие клетки биологической системы.

[0651] *Дестабилизированный:* Как используется в настоящем документе, термин «дестабилизированный», «дестабилизировать», «дестабилизирующая область» или «дестабилизирующий домен» означает область или молекулу, которая менее стабильна, чем исходная, эталонная, дикого типа или нативная форма той же области или молекулы.

[0652] *Сконструированный:* Как используется в настоящем документе, варианты осуществления изобретения являются «сконструированными», когда они сконструированы таким образом, чтобы иметь особенность или свойство, структурное или химическое, которое отличается от исходной точки, дикого типа или нативной молекулы.

[0653] *Экспрессия:* Используемый в данном документе термин «экспрессия» последовательности нуклеиновой кислоты относится к одному или более из следующих событий: (1) продукции матрицы РНК из последовательности ДНК (например, путем транскрипции); (2) процессинга РНК-транскрипта (например, путем сплайсинга, редактирования, образования 5'-кэп-структуры и/или процессинга 3'-конца); (3) трансляции РНК в полипептид или белок; (4) сворачивания полипептида или белка; и (5) посттрансляционной модификации полипептида или белка.

[0654] *Особенность:* Как используется в настоящем документе, «особенность» означает характеристику, свойство или отличительный элемент.

[0655] *Состав:* Как используется в настоящем документе, «состав» включает по меньшей мере соединение и/или композицию по настоящему изобретению и агент доставки.

[0656] *Фрагмент:* «Фрагмент», как используется в данном документе, относится к части. Например, фрагменты белков могут включать полипептиды, полученные путем расщепления полноразмерного белка. В некоторых вариантах осуществления фрагмент белка содержит по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250 или более аминокислот. В некоторых вариантах осуществления фрагменты антитела включают части антитела.

[0657] *Функциональный:* Как используется в настоящем документе, «функциональная» биологическая молекула представляет собой биологическую структурную единицу со структурой и в форме, в которой он проявляет свойство и/или активность, которыми он характеризуется.

[0658] *Иммунные клетки*: термин «иммунная клетка», как он используется в настоящем документе, относится к любой клетке иммунной системы, которая происходит из гемопоэтической стволовой клетки в костном мозге, из которой происходят две основные линии: миелоидные клетки-предшественники (от которых происходят миелоидные клетки, такие как моноциты, макрофаги, дендритные клетки, мегакариоциты и гранулоциты) и лимфоидные клетки-предшественники (от которых происходят лимфоидные клетки, такие как Т-клетки, В-клетки и естественные клетки-киллеры (NK)). Типичные клетки иммунной системы включают CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки, CD4− CD8− двойные негативные Т-клетки, Т γδ-клетки, а Тαβ-клетки, регуляторные Т-клетки, естественные клетки-киллеры и дендритные клетки. Макрофаги и дендритные клетки могут называться «антигенпрезентирующими клетками» или «АПК», они являются специализированными клетками, которые могут активировать Т-клетки, при взаимодействии рецептора главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) на поверхности АПК в комплекс с пептидом, с ТКР на поверхности Т-клетки.

[0659] *Иммунотерапия*: термин «иммунотерапия», используемый в настоящем документе, относится к типу лечения заболевания путем индукции или восстановления реактивности иммунной системы по отношению к заболеванию.

[0660] *Иммунотерапевтический агент*: термин «иммунотерапевтический агент», используемый в настоящем документе, относится к лечению заболевания путем индукции или восстановления реактивности иммунной системы по отношению к заболеванию с помощью биологического, фармацевтического или химического соединения.

[0661] *In vitro:* Как используется в настоящем документе, термин «in vitro» относится к явлениям, происходящим в искусственной среде, например, в пробирке или реакционном сосуде, в культуре клеток, в чашке Петри и т.д., а не внутри организма (например, животного, растения или микроорганизма).

[0662] *In vivo*: Как используется в настоящем документе, термин «in vivo» относится к явлениям, происходящим внутри организма (например, животного, растения, микроорганизма или их клетки или ткани).

[0663] *Линкер:* Как используется в настоящем документе, линкер относится к фрагменту, который соединяет два или более доменов, фрагментов или структурных единиц. В одном варианте осуществления линкер может состоять из 10 или более атомов. В другом варианте осуществления линкер может включать группу атомов, например, 10-1000 атомов, и может состоять из атомов или групп, таких как, помимо прочего, углерод, амино, алкиламино, кислород, сера, сульфоксид, сульфонил, карбонил и имин. В некоторых вариантах осуществления линкер может включать одну или более нуклеиновых кислот, состоящих из одного или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления линкер может включать аминокислоту, пептид, полипептид или белок. В некоторых вариантах осуществления фрагмент, связанный линкером, может включать, помимо прочего, атом, химическую группу, нуклеозид, нуклеотид, азотистое основание, сахар, нуклеиновую кислоту, аминокислоту, пептид, полипептид, белок, белковый комплекс, полезную нагрузку (например, терапевтический агент) или маркер (включая, помимо прочего, химический, флуоресцентный, радиоактивный или биолюминесцентный маркер). Линкер можно использовать для любых пригодных целей,

например, для образования мультимеров или конъюгатов, а также для введения полезной нагрузки, как описано в настоящем документе. Примеры химических групп, которые могут быть включены в линкер, включают, помимо прочего, алкил, алкенил, алкинил, амидо, амино, эфир, тиоэфир, сложный эфир, алкилен, гетероалкилен, арил или гетероциклил, каждый из которых может быть по выбору замещен, как описано в настоящем документе. Примеры линкеров включают, помимо прочего, ненасыщенные алканы, полиэтиленгликоли (например, мономерные единицы этилен- или пропиленгликоля, например, диэтиленгликоль, дипропиленгликоль, триэтиленгликоль, трипропиленгликоль, тетраэтиленгликоль или тетраэтиленгликоль) и полимеры декстрана. Другие примеры включают, помимо прочего, расщепляемые фрагменты внутри линкера, такие как, например, дисульфидная связь (-S-S-) или азосоединение (-N=N-), которые могут быть расщеплены с помощью восстановителя или фотолиза. Неограничивающие примеры селективно расщепляемых связей включают амидную связь, которая может быть расщеплена, например, при использовании трис(2-карбоксиэтил)-фосфина (TCEP) или других восстановителей и/или фотолиза, а также сложноэфирную связь, которая может быть расщеплена, например, при кислотном или основном гидролизе.

[0664] *Контрольная точка/фактор:* Как используется в настоящем документе, фактор контрольной точки - это любой фрагмент или молекула, функция которых действует на стыке процессов. Например, белок, лиганд или рецептор контрольной точки может функционировать для остановки или ускорения клеточного цикла.

[0665] *Метаболит:* Метаболиты - это промежуточные продукты метаболических реакций, катализируемых ферментами, которые естественным образом происходят внутри клеток. Этот термин обычно используется для описания низкомолекулярных веществ, фрагментов более крупных биомолекул или продуктов переработки.

[0666] *Модифицированный:* Как используется в настоящем документе, термин «модифицированный» относится к измененному состоянию или структуре молекулы или структурной единицы по сравнению с родительской или эталонной молекулой или структурной единицей. Молекулы могут быть изменены многими способами, в том числе химически, структурно и функционально. В некоторых вариантах осуществления соединения и/или композиции по настоящему изобретению модифицированы путем введения неприродных аминокислот.

[0667] *Мутация:* Как используется в настоящем документе, термин «мутация» относится к замене и/или изменению. В некоторых вариантах осуществления мутации могут быть заменами и/или изменениями белков (включая пептиды и полипептиды) и/или нуклеиновых кислот (включая полинуклеиновые кислоты). В некоторых вариантах осуществления мутации включают замены и/или изменения в последовательности белка и/или нуклеиновой кислоты. Такие замены и/или изменения могут включать добавление, замену или удаление одной или более аминокислот (в случае белков и/или пептидов) и/или нуклеотидов (в случае нуклеиновых кислот и/или полинуклеиновых кислот, например, полинуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления, где мутации включают добавление и/или замену аминокислот и/или нуклеотидов, такие добавления и/или замены могут включать 1 или более остатков аминокислот и/или нуклеотидов и могут включать модифицированные аминокислоты и/или нуклеотиды. Полученная в результате мутации, изменения или перестройки конструкция, молекула или последовательность может быть названа в настоящем документе мутантом.

[0668] *Неоантиген*: термин «неоантиген», как он используется в настоящем документе, относится к опухолевому антигену, который присутствует в опухолевых клетках, но не в нормальных клетках, и не вызывает делецию когнатных антигенспецифических Т-клеток в тимусе (т.е. центральную толерантность). Эти опухолевые неоантигены могут служить «чужеродным» сигналом, подобно патогенам, чтобы вызвать эффективный иммунный ответ, необходимый для иммунотерапии рака. Неоантиген может быть ограничен конкретной опухолью. Неоантиген - это пептид/белок с миссенс-мутацией (миссенс неоантиген) или новый пептид с длинными, совершенно новыми участками аминокислот из новых открытых рамок считывания (neoORF). NeoORF могут возникать в некоторых опухолях в результате находящихся вне рамки вставок или делеций (из-за дефектов в мисмэч-репарации ДНК, вызывающих микросателлитную нестабильность), слияния генов, мутаций прочитывания терминатора в стоп-кодонах или трансляции неправильно сплайсированной РНК (например, Saeterdal et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 13255-13260).

[0669] *Нецелевой:* Как используется в настоящем документе, «нецелевой» означает любое непреднамеренное воздействие на любую одну или более мишеней, генов, клеточных транскриптов, клеток и/или тканей.

[0670] *Функционально связанный:* Как используется в настоящем документе, фраза «функционально связанный» относится к функциональной связи между двумя или более молекулами, конструкциями, транскриптами, структурными единицами, молекулами или тому подобным.

[0671] *Полезная нагрузка или представляющая интерес полезная нагрузка (POI)*: термины «полезная нагрузка» и «представляющая интерес полезная нагрузка (POI)», используемые в настоящем документе, являются взаимозаменяемыми. Под представляющей интерес полезной нагрузкой (POI) понимают любой белок или соединение, функция которого должна быть изменена. В контексте настоящего изобретения POI является компонентом иммунной системы, включая как врожденную, так и адаптивную иммунные системы. Представляющие интерес полезные нагрузки могут представлять собой белок, слитую конструкцию, кодирующую слитый белок, или некодирующий ген, или их вариант и фрагмент. Представляющая интерес полезная нагрузка, если она основана на аминокислотах, может быть названа представляющим интерес белком.

[0672] *Фармацевтически приемлемые эксципиенты*: термин «фармацевтически приемлемый эксципиент», как используется в настоящем документе, относится к любому ингредиенту, кроме активных агентов (например, как описано в настоящем документе), присутствующих в фармацевтических композициях и обладающих свойствами быть по существу нетоксичными и не вызывать воспаления у субъектов. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемые эксципиенты представляют собой носители, способные суспендировать и/или растворять активные агенты. Наполнители могут включать, например, следующее: антиадгезивы, антиоксиданты, связывающие вещества, покрытия, добавки для прессования, разрыхлители, красящие вещества (красители), мягчительные средства, эмульгаторы, наполнители (разбавители), пленкообразователи или покрытия, вкусоароматические добавки, ароматизаторы, вещества, способствующие скольжению (усилители сыпучести), смазывающие вещества, консерванты, печатные краски, сорбенты, суспендирующие или диспергирующие средства, подсластители и гидратационную воду. Иллюстративные наполнители включают, без ограничения, следующие: бутилированный гидрокситолуол (BHT), карбонат кальция, фосфат кальция (двухосновный), стеарат кальция,

кросскармелозу, сшитый поливинилпирролидон, лимонную кислоту, кросповидон, цистеин, этилцеллюлозу, желатин, гидроксипропилцеллюлозу гидроксипропилметилцеллюлозу, лактозу, стеарат магния, мальтит, маннит, метионин, метилцеллюлозу, метилпарабен, микрокристаллическую целлюлозу, полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, повидон, прежелатинизированный крахмал, пропилпарабен, ретинилпальмитат, шеллак, диоксид кремния, натрий-карбоксиметилцеллюлозу, цитрат натрия, натрий-гликолят крахмала, сорбит, крахмал (кукурузный), стеариновую кислоту, сахарозу, тальк, диоксид титана, витамин А, витамин Е, витамин С и ксилит.

[0673] *Фармацевтически приемлемые соли*: Фармацевтически приемлемые соли описанных в данном документе соединений представляют собой формы соединений по изобретению, в которых кислотный или основной фрагмент находится в форме соли (например, полученной в результате реакции свободной основной группы с подходящей органической кислотой). Примеры фармацевтически приемлемых солей включают, но не ограничиваются ими, соли минеральных или органических кислот с основными остатками, такими как амины; щелочные или органические соли кислотных остатков, таких как карбоновые кислоты; и тому подобное. Репрезентативные кислотно-аддитивные соли включают ацетат, уксусную кислоту, адипинат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензолсульфоновую кислоту, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанепропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, глюкогептонат, глицерофосфат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидробромид, гидрохлорид, гидроиодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, толуолсульфонат, ундеканоат, валератные соли и тому подобное. Репрезентативные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают соли натрия, лития, калия, кальция, магния и тому подобное, а также нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и амина, включая, но не ограничиваясь этим, аммоний, тетраметиламмоний, тетраэтиламмоний, метиламин, диметиламин, триметиламин, триэтиламин, этиламин и тому подобное. Фармацевтически приемлемые соли включают обычные нетоксичные соли, например, из нетоксичных неорганических или органических кислот. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемую соль получают из родительского соединения, содержащего основное или кислотное соединение, обычными химическими методами. Как правило, такие соли могут быть получены взаимодействием форм этих соединений в виде свободной кислоты или основания со стехиометрическим количеством подходящего основания или кислоты в воде или в органическом растворителе или в их смеси; как правило, неводные среды, такие как эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил, являются предпочтительными. Списки подходящих солей можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418, Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, P.H. Stahl и C.G. Wermuth (eds.), Wiley-VCH, 2008, и Berge et al., Journal of Pharmaceutical Science, 66, 1-19 (1977), каждая из которых включена в данный документ во всей полноте посредством ссылки. *Фармацевтически приемлемый сольват:* Термин «фармацевтически приемлемый сольват», как используется в настоящем документе, относится к кристаллической форме соединения, в которой молекулы подходящего растворителя включены в кристаллическую решетку. Например, сольваты могут быть получены путем кристаллизации, перекристаллизации или осаждения из раствора, включающего органические растворители, воду или их смесь. Примерами подходящих

растворителей являются этанол, вода (например, моно-, ди- и тригидраты), N-метилпирролидинон (НМП), диметилсульфоксид (ДМСО), N, N'-диметилформамид (ДМФ), N, N'-диметилацетамид (ДМАЦ), 1,3-диметил-2-имидазолидинон (DMEU), 1,3-диметил-3,4,5,6-тетрагидро-2-(1H)-пиримидинон (DMPU), ацетонитрил (АЦН), пропиленгликоль, этилацетат, бензиловый спирт, 2-пирролидон, бензилбензоат и тому подобное. Когда растворителем является вода, сольват называют «гидратом». В некоторых вариантах осуществления растворитель, включенный в сольват, имеет тип или уровень, физиологически переносимый организмом, которому вводят сольват (например, в стандартной лекарственной форме фармацевтической композиции).

[0674] *Стабильный:* Как используется в настоящем документе, «стабильный» означает соединение или структурную единицу, которая достаточно прочна, чтобы выдержать выделение до приемлемой степени чистоты из реакционной смеси, и предпочтительно способен к включению в эффективный терапевтический агент.

[0675] *Стабилизированный:* Как используется в настоящем документе, термин «стабилизировать», «стабилизированный», «стабилизированная область» означает сделать или стать стабильным. В некоторых вариантах осуществления стабильность измеряется относительно абсолютного значения. В некоторых вариантах осуществления стабильность измеряется относительно вторичного статуса или состояния, или эталонного соединения или структурной единицы.

[0676] *Стандартный CAR:* Как используется в настоящем документе, термин «стандартный CAR» относится к стандартной конструкции химерного антигенного рецептора. Компоненты слитого белка CAR, включая внеклеточный фрагмент scFv, трансмембранный домен и один или более внутриклеточных доменов, сконструированы линейно в виде единого слитого белка.

[0677] *Элемент ответа на стимул (SRE)*: Термин «элемент ответа на стимул (SRE)», как используется в настоящем документе, представляет собой компонент эффекторного модуля, который присоединен, прикреплен, связан или связан с одной или более полезными нагрузками эффекторного модуля и в некоторых случаях отвечает за реакцию эффекторного модуля на один или более стимулов. Как используется в настоящем документе, способность «ответа» SRE на стимул может характеризоваться ковалентным или нековалентным взаимодействием, прямой или непрямой ассоциацией, структурной или химической реакцией на стимул. Кроме того, ответ любого SRE на стимул может быть вопросом степени или вида. Ответ может быть частичным. Ответ может быть обратимым. В конечном итоге ответ может привести к появлению регулируемого сигнала или выхода. Такой выходной сигнал может иметь относительный характер по отношению к стимулу, например, производить модулирующий эффект от 1 до 100 или фактическое увеличение или уменьшение, такое как 2-кратное, 3-кратное, 4-кратное, 5-кратное, 10-кратное или более. Одним не ограничивающим примером SRE является дестабилизирующий домен (ДД).

[0678] *Субъект:* Используемый в данном документе термин «субъект» или «пациент» относится к любому организму, которому можно вводить композицию в соответствии с данным раскрытием, например, для экспериментальных, диагностических, профилактических и/или терапевтических целей. Иллюстративные субъекты включают животных (например, млекопитающих, таких как мыши, крысы, кролики, приматы, отличные от человека, и люди) и/или растения.

[0679] *Т-клетка:* Т-клетка - это иммунная клетка, которая продуцирует Т-клеточные рецепторы (ТКР). Т-клетки могут представлять собой наивные клетки (не подвергавшиеся воздействию антигена; у них наблюдается повышенная экспрессия CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD127 и CD45RA и сниженная экспрессия CD45RO по сравнению с T_{CM}), Т-клетки памяти (T_M) (подвергавшиеся воздействию антигена и долгоживущие) и эффекторные клетки (подвергавшиеся воздействию антигена, цитотоксические). T_M могут быть далее разделены на подмножества Т-клеток центральной памяти (T_{CM}, повышенная экспрессия CD62L, CCR7, CD28, CD127, CD45RO и CD95 и пониженная экспрессия CD54RA по сравнению с наивными Т-клетками и эффекторными Т-клетками памяти (T_{EM}, пониженная экспрессия CD62L, CCR7, CD28, CD45RA и повышенная экспрессия CD127 по сравнению с наивными Т-клетками или T_{CM}). Эффекторные Т-клетки (T_E) относятся к подвергавшимся воздействию антигена CD8+ цитотоксическим Т-лимфоцитам, которые имеют пониженную экспрессию CD62L, CCR7, CD28 и являются позитивными в отношении гранзима и перфорина по сравнению с T_{CM}. Другие типичные Т-клетки включают регуляторные Т-клетки, такие как CD4+ CD25+ (Foxp3 +) регуляторные Т-клетки и Treg17-клетки, а также Tr1, Th3, CD8+ CD28− и Qa-1-рестриктированные Т-клетки.

[0680] *Т-клеточный рецептор*: Т-клеточный рецептор (ТКР) - это член суперсемейства иммуноглобулинов, имеющий вариабельный антигенсвязывающий домен, константный домен, трансмембранную область и короткий цитоплазматический хвост, который способен специфически связываться с антигенным пептидом, связанным с рецептором ГКГС. ТКР может быть обнаружен на поверхности клетки или в растворимой форме и обычно состоит из гетеродимера, имеющего α и β цепи (также известные как ТКРα и ТКРβ, соответственно) или цепи γ и δ (также известные как ТКРγ и ТКРδ, соответственно). Внеклеточная часть цепей ТКР (например, α-цепь, β-цепь) содержит два иммуноглобулиновых домена, вариабельный домен (например, вариабельный домен α-цепи или V_α, вариабельный домен β-цепи или V_β) на N-конце, и один константный домен (например, константный домен α-цепи или C_α и константный домен β-цепи или C_β,), прилегающий к клеточной мембране. Подобно иммуноглобулину, вариабельные домены содержат определяющие комплементарность области (CDR), разделенные каркасными областями (FR). ТКР обычно связан с комплексом CD3, образуя комплекс ТКР. Используемый в данном документе термин «комплекс ТКР» относится к комплексу, образованному в результате ассоциации CD3 с ТКР. Например, комплекс ТКР может состоять из цепи CD3γ, цепи CD3δ, двух цепей CD3ε, гомодимера цепей CD3ζ, цепи ТКРα и цепи ТКРβ. Альтернативно, комплекс ТКР может состоять из цепи CD3γ, цепи CD3δ, двух цепей CD3ε, гомодимер цепей CD3ζ, цепь ТКРγ и цепь ТКРδ. «Компонент комплекса ТКР» при использовании в данном документе относится к цепи ТКР (т. е., ТКРα, ТКРβ, ТКРγ или ТКРδ), цепи CD3 (т.е., CD3γ, CD3δ, CD3ε или CD3ζ) или комплексу, образованному из двух или более цепей ТКР или цепей CD3 (например, комплекс ТКРα и ТКРβ, комплекс ТКРγ и ТКРδ, комплекс CD3ε и CD3δ, комплекс CD3γ и CD3ε или суб-ТКР комплекс, состоящий из ТКРα, ТКРβ, CD3γ, CD3δ и двух цепей CD3ε.

[0681] *Терапевтически эффективное количество:* Используемый в данном документе термин «терапевтически эффективное количество» означает количество доставляемого агента (например, нуклеиновой кислоты, лекарственного средства, терапевтического агента, диагностического агента или профилактического агента и т.д.) которое является достаточным при введении субъекту, страдающему или подверженному инфекции, заболеванию, расстройству и/или патологическому состоянию, для лечения, улучшения симптомов, диагностики, предотвращения и/или задержки начала инфекции, заболевания,

расстройства и/или патологического состояния. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество предоставляется в однократной дозе. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество препарата вводят в режиме дозирования, включающем множество доз. Специалистам в данной области будет понятно, что в некоторых вариантах осуществления стандартная лекарственная форма может считаться включающей терапевтически эффективное количество конкретного агента или структурной единицы, если она включает количество, которое эффективно при введении в рамках такого режима дозирования.

[0682] *Лечение или процесс лечения:* Как используется в настоящем документе, термины «лечение» или «процесс лечения» обозначают подход для получения приемлемого или желаемого результата, включая и предпочтительно полезный или желаемый клинический результат. Такие полезные или желаемые клинические результаты включают, помимо прочего, один или более из следующих: уменьшение пролиферации (или уничтожение) раковых клеток или других пораженных заболеванием, уменьшение метастазирования раковых клеток, обнаруженных в раковых опухолях, уменьшение размеров опухоли, уменьшение симптомов, вызванных заболеванием, повышение качества жизни страдающих от заболевания, уменьшение дозы других лекарств, необходимых для лечения заболевания, задержка прогрессирования заболевания и/или продление выживания людей.

[0683] *Настройка:* Как используется в данном документе, термин «настраивать» означает регулировать, балансировать или адаптировать что-то в ответ на стимул или для достижения определенного результата. В одном не ограничивающем примере, SRE и/или ДД по настоящему изобретению регулируют, балансируют или адаптируют функцию или структуру композиций, к которым они прикреплены, присоединены или связаны с ними в ответ на определенные стимулы и/или среду.

ЭКВИВАЛЕНТЫ И ОБЪЕМ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0684] Специалисты в данной области узнают или смогут установить, используя не более чем обычные эксперименты, множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления в соответствии с изобретением, описанным в настоящем документе. Объем настоящего изобретения не ограничивается приведенным выше описанием, а скорее соответствует прилагаемой формуле изобретения.

[0685] В формуле изобретения формы единственного числа могут означать один или более чем один, если не указано обратное или если иное не следует из контекста. Пункты формулы или описания, включающие «или» между одним или более членами группы, считаются удовлетворяющими, если один, более одного или все члены группы присутствуют, используются или иным образом относятся к данному продукту или способу, если не указано обратное или если иное не следует из контекста. Изобретение включает варианты осуществления, в которых именно один член группы присутствует, используется в или иным образом относится к данному продукту или процессу. Изобретение включает варианты осуществления, в которых более одного или все члены группы присутствуют, используются или иным образом относятся к данному продукту или процессу.

[0686] Следует также отметить, что термин «содержащий» является открытым и допускает, но не требует, включения дополнительных элементов или этапов. Когда в настоящем документе используется термин «содержащий», термин «состоящий из», таким образом, также охватывается и описывается.

[0687] Там, где указаны диапазоны, включены конечные точки. Кроме того, следует понимать, что если не указано иное или если иное не следует из контекста и понимания специалиста в данной области техники, значения, выраженные в виде диапазонов, могут принимать любое конкретное значение или поддиапазон в пределах указанных диапазонов в различных вариантах осуществления изобретения, вплоть до десятых долей единицы нижнего предела диапазона, если контекст явно не указано иное.

[0688] Кроме того, следует понимать, что любой конкретный вариант осуществления настоящего изобретения, который относится к известному уровню техники, может быть явно исключен из любого одного или более пунктов формулы изобретения. Поскольку считается, что такие варианты осуществления известны специалисту в данной области техники, они могут быть исключены, даже если исключение не указано в данном документе в явном виде. Любой конкретный вариант осуществления композиций по изобретению (например, любой антибиотик, терапевтический или активный ингредиент; любой способ получения; любой способ применения; и т.д.) могут быть исключены из любого одного или более пунктов формулы изобретения по любой причине, связанной или не связанной с существованием известного уровня техники.

[0689] Следует понимать, что использованные слова являются словами описания, а не ограничения, и что изменения могут быть сделаны в рамках прилагаемой формулы изобретения без отклонения от истинного объема и духа изобретения в его более широких аспектах.

[0690] Хотя настоящее изобретение было описано достаточно подробно и с некоторыми особенностями в отношении нескольких описанных вариантов осуществления, не предполагается, что оно должно быть ограничено какими-либо такими особенностями или вариантами осуществления или каким-либо конкретным вариантом осуществления, но оно должно быть истолковано со ссылками на прилагаемую формулу изобретения таким образом, чтобы обеспечить максимально широкое толкование такой формулы с учетом уровня техники и, следовательно, эффективно охватить предполагаемый объем изобретения. Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими неограничивающими примерами.

ПРИМЕРЫ

[0691] В приведенных ниже примерах конструкции и ДД обозначены своими идентификаторами (например, OT-001976). Дополнительная информация о конструкциях и ДД может быть найдена в описании.

<u>Пример 1. Библиотека насыщения мутанта CA2</u>

[0692] Была создана библиотека мутантов, в которой каждая аминокислота в положении 2-260 SEQ ID NO: 11717 была мутирована Библиотека мутаций была слита с репортерным белком, например. AcGFP через линкер и трансдуцирована в клетки Jurkat. Клетки, экспрессирующие библиотеку, были отобраны с использованием селективного маркера mCherry. Клетки, экспрессирующие библиотеку, были подвергнуты «сортировке по нижнему уровню», в которой нижние 10% GFP-положительной популяции были отсортированы для сбора только клонов с самой низкой исходной экспрессией. Клетки, экспрессирующие библиотеку, обрабатывали 10 мкМ целекоксиба в течение 24 часов, а верхние 10% и верхние 10-30% GFP-положительных клеток сортировали отдельно и собирали, чтобы убедиться, что на этом этапе были отобраны только клетки с высокой экспрессией GFP в присутствии лиганда. Две популяции, т.е. верхние 10% и верхние 10-30% были объединены для последующего этапа сортировки, в которой нижние 22% GFP-экспрессирующих клеток были отсортированы и собраны. Итоговую библиотеку обрабатывали ДМСО или 10 мкМ целекоксиба и сравнивали с OT-001987 и OT-001515 (с мутацией W208S в CA2) в аналогичных

условиях. При обработке лигандом наблюдалась низкая исходная экспрессия и лиганд-зависимая стабилизация, хотя максимальная экспрессия была не такой высокой, как в случае конструкции OT-001987. По сравнению с OT-001987, OT-001515 показал лиганд-зависимую стабилизацию с целекоксибом. Геномная ДНК была выделена из конечной библиотеки, амплифицирована и вставлена в лентивирусный вектор с помощью сборки по Гибсону. В Таблице 16 приведены мутанты карбоангидразы 2, полученные этим методом, и частота их появления в конечной библиотеке. В Таблице 16 «*» обозначает трансляцию стоп-кодона. В Таблице 16 ID конструкции (OT-XXXXXX) относится к конструкции, которая включает в себя указанный мутант CA2, а ID библиотеки (LibCXXXXXX) относится к самому мутанту CA2.

Таблица 16. Мутанты библиотеки насыщения CA2

ID конструкции/ID библиотеки	Мутация	Частота
OT-001976	Y51N	28
OT-001977	S56N	23
LibC000098; LibC000097	Y51T	19
OT-001978	D72F; V241F; P249L	13
LibC000084	D71F; N231F	9
LibC000079; LibC000078	S56F	9
LibC000094	T35K; D72F; K260D	7
OT-001979	D71L; T87N; L250R	5
OT-001980	L183S	5
LibC000076	A77I; P249F	4
LibC000099	D71K; P249H	4
LibC000081	D72F; P249F	4
LibC000065	Q53N; N61Y	4
LibC000066; LibC000069	Y193I	3
LibC000056	S73N, R89Y	2
LibC000057	D71K, T192F	2
LibC000061	E238*	2
LibC000083	G144D	2
LibC000092	Y193L, K260L	2
LibC000053	V206M	1
LibC000054	D71F, V241F, P249L	1
LibC000055	Y193F	1
LibC000058	L147F, Q248F	1
LibC000059	D52I, S258P	1
LibC000060	D72S, T192N	1
LibC000062	D179E, T192I	1
LibC000063	Y193L	1

LibC000064	S56N, Q103K	1
LibC000067	D71Y, Q248L	1
LibC000068	S73N, R89F	1
LibC000070	D71K, N231L, E235G, L239F	1
LibC000071	D71F	1
LibC000072	D72F, P249I	1
LibC000074	T192N	1
LibC000075	D72X, V241X, P249X	1
LibC000077	A54X, S56X, L57X, T192X	1
LibC000080	Y193V, K260F	1
LibC000085	G63D, M240L	1
LibC000086	V134F, L228F	1
LibC000087	D71G, N231K	1
LibC000088	S56F, D71S	1
LibC000089	D52L, G128R, Q248F	1
LibC000091	S73X, R89X	1
LibC000093	Y193X	1
LibC000096	Y51X, D72X, V241X, P249X	1
LibC000100	D72I, W97C	1
LibC000102	D71K, T192F, N231F	1

[0693] Выбранные конструкции трансдуцировали в клетки NIH3T3 и ответ мутантов на возрастающие дозы ацетазоламида, целекоксиба или плацебо в течение 24 часов протестировали с помощью FACS. В Таблице 17 и Таблице 18 показаны МИФ без обработки лигандом, максимальное кратное изменение и EC_{50}. Показатель МИФ для всех протестированных конструкций увеличивался с увеличением дозы используемого лиганда. В общем, OT-001977 и OT-001979 показали самое сильное увеличение МИФ с обоими лигандами. Значения МИФ, полученные при обработке ацетазоламидом, были намного выше, чем значение МИФ, полученные при обработке целекоксибом.

Таблица 17. Зависимость доза-ответ для ацетазоламида

ID конструкции	**Исходный уровень МИФ**	**Макс. кратное изменение**	**EC50**
OT-001515	179	6,5	1,41
OT-001977	496	5,98	0,185

OT-001978	135,67	13,92	0,493
OT-001979	576,33	5,43	0,371
OT-001980	367,33	6,29	0,179

Таблица 18. Зависимость доза-ответ для целекоксиба

ID конструкции	**Исходный уровень МИФ**	**Макс. кратное изменение**	**EC50**
OT-001515	230,33	3,85	2,949
OT-001977	652	4,47	0,943
OT-001978	175,33	9,83	0,911
OT-001979	835	3,32	1,181
OT-001980	496	4,53	0,548

[0694] В качестве альтернативы, одноклеточные клоны получали путем сортировки флуоресцентно-активированных клеток из окончательно отсортированной объединенной библиотеки. Клоны тестировали путем обработки 10 мкМ ацетазоламида. Клоны, показавшие по меньшей мере 5-кратное увеличение экспрессии GFP по сравнению с обработкой плацебо, размножали. Выделяли геномную ДНК, амплифицировали DRD с помощью ПЦР и вставляли в лентивирусный вектор с помощью сборки по Гибсону. Был создан лентивирус и использован для заражения клеток Jurkat и создания стабильных клеточных линий. Клеточные линии характеризовали путем обработки ацетазоламидом в течение 24 часов и измерения экспрессии GFP с помощью проточной цитометрии.

<u>Пример 2. Мутанты CA2 с заменой цистеина на серин</u>

[0695] Мутации в цистеине в положении 205 SEQ ID NO: 11717 могут способствовать дестабилизации белка, который затем может быть стабилизирован добавлением лиганда. Для проверки этого цистеин в положении 205 был мутирован в серин и объединен с другими мутациями, показанными в Таблице 19. Созданные таким образом ДД CA2 были связаны с AcGFP и клонированы в лентивирусные векторы. Клетки Jurkat трансдуцировали лентивирусом, обрабатывали 10 мкМ в течение 24 часов и анализировали экспрессию GFP с помощью FACS. В Таблице 19 показана медианная интенсивность флуоресценции GFP для каждого условия.

Таблица 19. Зависимость доза-ответ для целекоксиба у мутантов по серину

Название образца	**Обработка**	**МИФ (AcGFP)**	**Коэффициент стабилизации**
Родительские Jurkat	ДМСО	71	-

	Целекоксиб	85,7	1,21
OT-001570	ДМСО	87,9	-
	Целекоксиб	101	1,15
OT-001681	ДМСО	90,7	-
	Целекоксиб	103	1,14
OT-001682	ДМСО	83,6	-
	Целекоксиб	101	1,21

[0696] Как показано в Таблице 19, добавление лиганда вызывало только увеличение коэффициента стабилизации до 1,2 при комбинированных мутациях, что говорит о том, что остаток цистеина не вносит существенного вклада в дестабилизацию ДД.

Пример 3. CA2-регулируемые химерные антигенные рецепторы

[0697] ДД CA2, описанные в настоящем документе, были операбельно соединены с CAR для получения настраиваемых конструкций CAR. Активированные Т-клетки человека-донора трансдуцировали 10 мкл лентивируса для указанных конструкций. На 6-й день размножения Т-клеток клетки инкубировали в течение ночи с 10 мкМ ацетазоламида или вальдекоксиба, как указано, или с ДМСО в качестве контроля. Экспрессия CAR на поверхности клеток была обнаружена на следующий день путем окрашивания клеток 10 мкг/мл CD19-Fc, а затем конъюгированным вторичным антителом к BV421 человека. Гистограммы были построены на основе гейта живых клеток. Аналогичные эксперименты также проводили на 8-й день, а клетки собирали на 9-й день. Данные представлены в Таблице 20 в виде процентного содержания CAR-положительных клеток. Коэффициент стабилизации также рассчитали и включили в Таблицу 20 как КС.

Таблица 20. % CAR-положительных клеток CA2

Конструкция	День размножения Т-клеток	ДМСО	10 мкМ ацетазоламида		10 мкМ вальдекоксиба	
		% CAR	% CAR	КС	% CAR	КС
OT-001988	7	23,7	59,2	2,5	40,3	1,7
	9	3,5	36,7	10,5	6,4	1,8
OT-001989	7	45,1	65	1,4	59,3	1,3
	9	5,9	42	7,1	19,0	3,2

[0698] Как показано в Таблице 20, исходная экспрессия CAR снижалась с 7-го по 9-й день. Обе конструкции показали лиганд-зависимую стабилизацию с ацетазоламидом и вальдекоксибом. Большая регуляция CAR наблюдалась при использовании ацетазоламида по сравнению с вальдекоксибом как на 7-й, так и на 9-й день, тогда как при обработке вальдекоксибом регуляция была более очевидной на 7 день.

[0699] Активированные Т-клетки человека-донора трансдуцировали 10 мкл лентивируса для указанных конструкций. На 8-й день размножения Т-клеток клетки инкубировали в течение ночи с титрами

ацетазоламида или вальдекоксиба, начиная с 10 мкМ и разбавляя в 3 раза, как указано. Экспрессия CAR на поверхности клеток была обнаружена на следующий день путем окрашивания клеток 10 мкг/мл CD19-Fc, а затем конъюгированным вторичным антителом к BV421 человека. Процент лиганд-индуцированных CAR+ клеток показан на основе гейта живых клеток по отношению к клеткам отрицательного контроля, обработанным плацебо. Как показано на Фиг. 1 и в Таблице 21, ацетазоламид был способен регулировать экспрессию CAR в OT-001988 и OT-001989 в клинически достижимых дозах. При использовании вальдекоксиба практически не наблюдалось лиганд-зависимой регуляции CAR.

Таблица 21. Регуляция экспрессии CAR при клинически достижимых дозах лиганда

	OT-001988		OT-001989	
Лиганд (мкМ)	Ацетазоламид	Вальдекоксиб	Ацетазоламид	Вальдекоксиб
0	3,91	3,11	6,07	5,73
0,000169	4,22	3,50	8,07	6,80
0,000508	4,41	4,59	6,28	6,44
0,00152	3,71	3,76	7,72	6,54
0,0045	4,67	3,91	7,19	7,31
0,0137	4,91	3,97	8,05	6,75
0,041	4,59	3,74	9,31	7,18
0,123	6,05	4,50	13,30	8,53
0,37	7,58	3,74	20,30	7,81
1,11	12,8	3,87	31,20	7,65
3,33	25,4	4,72	38,30	11,00
10	36,7	6,35	42,00	19,00

[0700] Активированные Т-клетки от донора-человека трансдуцировали 10 мкл лентивируса для конструкций OT-001988 и OT-001989. На 10 день экспансии Т-клеток клетки смешивали с клетками Nalm6-NucLightRed при соотношении клеток-эффекторов и клеток-мишеней (E: T) 10:1, 3:1, 1:1, 0,3:1, 0,1:1, 0,03:1 и обрабатывали либо 10 мкМ ацетазоламида, либо контролем (ДМСО) в течение 5 дней. Красные флуоресцентные изображения собирали и количественно оценивали каждые 2 часа с помощью Incucyte Zoom в качестве меры пролиферации опухолевых клеток Nalm6. Как показано в Таблице 22, в течение всего эксперимента, т.е. через 120 часов трансдуцированные вектором Т-клетки не подавляли пролиферацию Nalm6, но трансдуцированные конститутивным CAR OT-001407 (SEQ ID NO: 210963; кодируемые SEQ ID NO: 210964) Т-клетки ингибируют пролиферацию при культивировании в соотношении E:T, равном 10:1, 3:1 или 1:1. Т-клетки, трансдуцированные OT-001988 и OT-001989, демонстрируют уничтожение клеток Nalm6 в отсутствие лиганда при высоких соотношениях E:T, равных 10:1 и 3: 1, предполагающих исходную активность, но специфическое и регулируемое уничтожение в присутствии ацетазоламида при более низких соотношениях E:T, равных 1:1, 0,3:1, 0,1:1, 0,03:1.

Таблица 22. Специфическое и регулируемое уничтожение клеток при низких соотношениях эффектор:мишень

		OT-001407	OT-001988	OT-001989

Соотношение E:T	pELNS-001CD19		ДМСО	Ацетазоламид	ДМСО	Ацетазоламид
10:1	959649,6	5249,566	74146,59	7893,327	12465,3	7622,067
3:1	1127883	11229,93	1088639	19106,14	71778,56	23231,23
1:1	882079,4	42540,54	1003951	95252,77	774615,1	37405,95
0,3:1	926912,4	709645,5	1101745	751518,2	988053,8	441702,9
0,1:1	1049394	987900,1	977582,9	1005333	1024032	801499,2
0,03:1	1002171	919210	1042175	929015,9	978911,8	966327,7

[0701] Через 72 часа собрали супернатанты из совместной культуры и анализировали на уровни ИФН гамма и IL2 с помощью анализа MSD. Уровни цитокинов нормализовали как кратное изменение по сравнению с совместной культурой нетрансдуцированных Т-клеток с клетками Nalm6-NucLightRed. Результаты, представленные в Таблице 23 и Таблице 24, показывают, что трансдуцированные вектором Т-клетки не секретировали ИФНг или IL2, но трансдуцированные конститутивным CAR OT-001407 Т-клетки делали это в зависимости от клеточной дозы. Трансдуцированные ДД CA2 Т-клетки демонстрируют некоторую секрецию цитокинов в отсутствие лиганда при высоких соотношениях E:T, таких как 10:1 и 3:1, но специфическую и регулируемую секрецию цитокинов при соотношениях, равных 1:1, 0,3:1, 0,1:1 и 0,03:1, в присутствии лиганда.

Таблица 23. Специфическая и регулируемая секреция ИФН гамма при низком соотношении эффектор:мишень

Соотношение E:T	pELNS-001CD19	OT-001407	OT-001988		OT-001989	
			ДМСО	Ацетазоламид	ДМСО	Ацетазоламид
10:1	1,2	9	3,4	8,5	2,7	10,4
3:1	1,1	64	1,5	76,8	24,1	100,3
1:1	1	158,4	0,6	163,8	6,7	216,8
0,3:1	0,9	282,1	1	186,4	1	281,6
0,1:1	0,8	126,9	0,9	37,6	1,4	63,3
0,03:1	1	19,6	1	45,1	1	12,2

Таблица 24. Специфическая и регулируемая секреция IL2 при низком соотношении эффектор:мишень

Соотношение E:T	pELNS-001CD19	OT-001407	OT-001988		OT-001989	
			ДМСО	Ацетазоламид	ДМСО	Ацетазоламид
10:1	1,1	3,9	80,3	0,7	3,5	0,9
3:1	0,6	8,7	49,3	58,2	112,4	148
1:1	0,9	1016,7	8,3	1504,6	158,7	2105,2
0,3:1		1023	6,5	904,7	12,9	998,4

0,1:1		434,2	1,7	182,6	10,2	245,9
0,03:1		126,4	1	297,3	1,8	125,2

Пример 4. Скрининг дестабилизирующих мутантов карбоангидразы 2 человека

[0702] Для выявления дестабилизирующих мутаций CA2 человека, которые стабилизируются при связывании лиганда с CA2, было проведено два раунда скрининга мутантов с использованием лентивирусной библиотеки мутантов CA2, предоставленной компанией Genscript (Китай). Эти методы были использованы для создания библиотеки мутантных полипептидов с использованием праймеров для мутагенеза и ПЦР с ошибками. Лентивирусные векторы, экспрессирующие матрицу, CA2 человека дикого типа, функционально связанный с GFP(OT-001986) также были предоставлены компанией Genscript вместе с библиотекой мутантов CA2. Библиотека была упакована в лентивирус, трансдуцирована в клетки NIH3T3 при кратности заражения (MOI) приблизительно 0,3, и были получены пулы стабильных клеток путем отбора с маркером отбора пуромицином.

[0703] Для выявления пулов клеток, содержащих дестабилизирующие мутанты CA2, которые стабилизируются, когда CA2 связан с соответствующим лигандом, клетки сортировали с помощью FACS. В первом раунде были отобраны нижние 15% популяции, которые были GFP-отрицательными в отсутствие лиганда. Клетки размножали, затем обрабатывали 10 мкМ целекоксиба в течение 24 часов и собирали для сортировки клеток. Были собраны верхние 11 % GFP-положительных клеток, которые также отвечали на обработку лигандом по сравнению с необработанными. Целекоксиб удаляли из культур и заменяли на ДМСО. Клетки анализировали методом FACS и отбирали только те популяции клеток, которые не пересекались с популяциями из предыдущей сортировки, показавшими экспрессию GFP в присутствии целекоксиба. В отличие от исходной библиотеки CA2, библиотека после окончательной сортировки показала 4-6-кратное увеличение экспрессии GFP при обработке целекоксибом или вальдекоксибом по сравнению с обработкой контролем ДМСО. Выделяли геномную ДНК, и амплифицированные мутанты CA2 повторно вводили в лентивирусные векторы, в которых CA2 был функционально связан с GFP. Конструкции трансдуцировали в клетки NIH3T3 с помощью лентивирусных векторов для каждого клона. Клетки обрабатывали 10 мкМ вальдекоксиба или 10 мкМ целекоксиба в течение 24 часов и анализировали методом FACS. В Таблице 25 приведены медианная интенсивность флуоресценции, обозначенная как «Медианная PE», и коэффициент стабилизации, обозначенный как КС. В Таблице 25 ID конструкции (OT-XXXXXX) относится к конструкции, которая включает в себя указанный мутант CA2, а ID библиотеки (LibCXXXX) относится к самому мутанту CA2.

Таблица 25. Лиганд-зависимый ответ мутантов CA2

Конструкция	Обработка	Исходная	ДМСО	10 мкМ вальдекоксиба	10 мкМ целекоксиба
OT-001986	Медианная PE	93,7	33200	33000	35000
	КС		1	0,99	1,05

LibC000226	Медианная PE	93,7	441	3588	3816
	КС		1	7,93	8,65
OT-002006	Медианная PE	93,7	1763	9453	6983
	КС		1	5,36	3,96
OT-002001	Медианная PE	93,7	209	251	236
	КС		1	1,2	1,13
LibC000186	Медианная PE	93,7	816	6570	8156
	КС		1	8,05	10
LibC000193	Медианная PE	93,7	693	6445	7428
	КС		1	9,3	10,71
LibC000191	Медианная PE	93,7	160	177	173
	КС		1	1,11	1,08
LibC000208	Медианная PE	93,7	926	8006	8690
	КС		1	8,65	9,38
LibC000188	Медианная PE	93,7	206	228	225
	КС		1	1,11	1,09
LibC000211	Медианная PE	93,7	13000	19800	20800
	КС		1	1,52	1,6
LibC000212	Медианная PE	93,7	30100	30700	30700
	КС		1	1,02	1,02
LibC000198	Медианная PE	93,7	275	552	535
	КС		1	2	1,95
LibC000220	Медианная PE	93,7	311	408	384
	КС		1	1,31	1,2

[0704] В ответ на обработку лигандами LibC000198, LibC000208, LibC000193; LibC000186; OT-002006; LibC000226 показали коэффициент стабилизации более 2.

[0705] Ответ клеток NIH3T3 на различные дозы вальдекоксиба или целекоксиба в течение 24 часов измеряли и анализировали с помощью FACS. В Таблице 26 и Таблице 27 показана медианная интенсивность флуоресценции, обозначенная как «Мед», родительские клетки как «Р» и коэффициент стабилизации, обозначенный как КС, при обработке вальдекоксибом или целекоксибом, соответственно.

Таблица 26. Зависимость доза-ответ для вальдекоксиба мутантов CA2

Вал (мкМ)	OT-001986		LibC000226		OT-002006		LibC000186		LibC000193		LibC000208		LibC000218	
	Мед	КС	Мед	КС	Мед	КС	Мед	КС	Мед	КС	Мед	КС	Мед	КС
Р	82,7		83,3		83,3		82,7		82,7		82,7		82,7	
0	21600	1	531	1	1663	1	934	1	826	1	906	1	145	1
0,03	-	-	580	1,09	1962	1,18	1223	1,31	932	1,13	1049	1,16	156	1,08
0,1	-	-	623	1,17	1978	1,19	1217	1,3	1013	1,23	1131	1,25	157	1,08
0,3	-	-	655	1,23	2038	1,23	1363	1,46	1064	1,29	1219	1,35	157	1,08
1	-	-	873	1,64	2185	1,31	1711	1,83	1583	1,92	1747	1,93	159	1,1
3	22400	1,04	1572	2,96	3023	1,82	3357	3,59	3667	4,44	3603	3,98	161	1,11
10	23600	1,09	3902	7,35	6301	3,79	7890	8,45	7449	9,02	8284	9,14	157	1,08
30	23700	1,1	6245	11,76	9736	5,85	11800	12,63	9460	11,45	11300	12,48	150	1,03

Таблица 27. Зависимость доза-ответ для целекоксиба мутантов CA2

Цел (мкМ)	OT-001986		LibC000226		OT-002006		LibC000186		LibC000193		LibC000208		LibC000218	
	Мед	КС	Мед	КС	Мед	КС	Мед	КС	Мед	КС	Мед	КС	Мед	КС
Р	82,7		83,3		83,3		82,7		82,7		82,7		82,7	
0	21600	1	531	1	1663	1	934	1	826	1	906	1	145	1
0,03			711	1,34	2006	1,21	1177	1,26	935	1,13	1017	1,12	155	1,07

0,1			661	1,24	2159	1,3	1290	1,38	1005	1,22	1194	1,32	160	1,1
0,3			750	1,41	2458	1,49	1470	1,57	1211	1,47	1457	1,61	162	1,12
1			1207	2,27	3649	2,19	2065	2,21	2058	2,49	2221	2,45	160	1,1
3	21700	1	2544	4,79	6341	3,81	4171	4,47	4283	5,19	5404	5,96	165	1,14
10	23900	1,11	5227	9,84	10200	6,13	8202	8,78	7751	9,38	9766	10,78	182	1,26
30	23700	1,1	7171	13,5	13100	7,88	10200	10,92	11100	13,44	13200	14,57	236	1,63

[0706] LibC000226, OT-002006, LibC000186, LibC000193 и LibC000208 показали дозозависимую стабилизацию при обработке вальдекоксибом или целекоксибом.

[0707] Лиганд-зависимая стабилизация LibC000226, OT-002006, LibC000186, LibC000193 и LibC000208 была также подтверждена обработкой клеток NIH3T3 1, 3, 10 или 30 мкМ целекоксиба или вальдекоксиба в течение 24 часов. Экспрессию белка в присутствии лиганда измеряли путем иммуноблотинга клеточных лизатов на GFP. Все протестированные конструкции показали стабилизацию GFP при увеличении дозы лиганда. В конструкции OT-001986 не наблюдалось изменения экспрессии ни в присутствии, ни в отсутствии лиганда.

[0708] Ответ клеток NIH3T3 на различные дозы ацетазоламида в течение 24 часов измеряли и анализировали с помощью FACS. В Таблице 28 приведены медианная интенсивность флуоресценции, обозначенная как «Медианная FITC», и коэффициент стабилизации, обозначенный как КС, для ацетазоламида.

Таблица 28. Зависимость доза-ответ для ацетазоламида мутантов CA2

Конструкция	Описание	Исходная	ДМСО	Ацетазоламид (мкМ)						
				0,03	0,1	0,3	1	3	10	30
OT-001986	Медианная FITC	74	17100	17400	17800	18400	19300	20200	20900	22400
	Кратность изменения	-	1	1,02	1,04	1,08	1,13	1,18	1,22	1,31
LibC000226	Медианная PE	74	380	499	704	1360	3594	6645	9295	10900
	Кратность изменения	-	1	1,31	1,85	3,58	9,46	17,49	24,46	28,68
OT-002006	Медианная PE	74	1529	2096	2836	1564	9825	14400	17300	18400

	Кратность изменения	-	1	1,37	1,85	1,02	6,43	9,42	11,31	12,03
LibC000186	Медианная PE	74	734	872	867	903	936	943	1189	1827
	Кратность изменения	-	1	1,19	1,18	1,23	1,28	1,28	1,62	2,49
LibC000193	Медианная PE	74	557	854	1628	3669	7445	10200	11900	12900
	Кратность изменения	-	1	1,53	2,92	6,59	13,34	18,31	21,36	23,16
LibC000208	Медианная PE	74	757	1190	2137	4715	9970	13900	16900	17800
	Кратность изменения	-	1	1,57	2,82	6,23	13,17	18,36	22,32	23,51

[0709] Все протестированные конструкции ДД CA2/ CA2, включая LibC000208, показали стабилизацию экспрессии GFP по типу доза-ответ в ответ на ацетазоламид.

[0710] Лиганд-зависимая стабилизация LibC000184, OT-002006, LibC000186, LibC000193 и LibC000208 была также подтверждена путем обработки клеток NIH3T3 0,3, 1, 3, 10 или 30 мкМ ацетазоламида в течение 24 часов. Экспрессию белка в присутствии лиганда измеряли путем иммуноблотинга клеточных лизатов на GFP. Все протестированные конструкции показали стабилизацию GFP при увеличении дозы лиганда. В конструкции OT-001986 не наблюдалось изменения экспрессии ни в присутствии, ни в отсутствии лиганда.

[0711] Клоны, обработанные различными лигандами, сравнивали для изучения поведения каждого мутанта с лигандами. Для того чтобы сравнить результаты экспериментов, проведенных в разные дни, данные по целекоксибу и вальдекоксибу нормализовали следующим образом: (МИФ (эксперимент, день x) / МИФ (исходный, день x)) *МИФ (исходный, день1), где исходный, день 1 представлял значения ДМСО для клонов, обработанных ацетазоламидом. Результаты показаны в таблице 29.

Таблица 29. Сравнительный анализ мутантов CA2

ID клона	ДМСО	Ацетазоламид, 10 мкМ	Ацетазоламид, 30 мкМ	Целекоксиб, мкМ	Вальдекоксиб, мкМ
LibC000184	380	9295	10900	4660,217	3478,892
LibC000193	557	11900	12900	6910,53	6641,277
LibC000186	734	1189	1827	7312,627	7034,458
LibC000208	757	16900	17800	8707,036	7385,735
OT-002006	1529	17300	18400	9093,976	5617,759
LibC000211	10344,09	-	-	16550,54	15754,84
OT-001986	17100	20900	22400	-	-

Пример 5. Активность химерных конструкций *in vitro*

[0712] На первичных Т-клетках человека тестировали *in vitro* активность химерных конструкций IL15 OT-002019 ((Met; CD34 (aa 1-32 ДТ, M1G, S32A); IL15 (30-162 ДТ); линкер ((GS)15); петля и трансмембранный домен CD8a; линкер (GS); стоп), аминокислотная последователность SEQ ID NO: 210876, последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 210877) и OT-002090 ((лидерная последовательность легкой цепи Ig каппа; IL15 (49-162 ДТ); линкер ((GS)15); петля B7-1, трансмембранный домен и хвост; линкер (GS); стоп), аминокислотная последователность SEQ ID NO: 210878, последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 210879) и химерной конструкции регулируемого CA2 IL15 (OT-002094). Первичные Т-клетки человека трансдуцировали лентивирусом через 24 часа после активации шариками с CD3/CD28. Клетки размножали в течение 10 дней. Экспрессию регулируемого IL15 анализировали на 6-й день методом проточной цитометрии после 24-часовой обработки 10 мкМ ацетазоламида (Ацз). Процент IL15-положительных клеток, полученных для каждой группы обработки, выглядит следующим образом (a) OT-002019: 82,3% (b) OT-002090: 43,6% (c) OT-002094 с ДМСО: 0,7 % (d) OT-002094 с 10 мкМ Ацз: 27,9% и (e) нетрансдуцированные (HT): 0,3%.

[0713] Чтобы проверить IL15-зависимое размножение, на 10-й день удаляли шарики и промывали клетки. Затем экспрессирующие IL15 или контрольные Т-клетки культивировали в свежей культуральной среде отдельно или в присутствии ацетазоламида или экзогенного IL15 (1 нг/мл) в течение 10 дней. Количество Т-клеток (Таблица 30) и изменение соотношения CD4/CD8 (Таблица 31) определяли с помощью проточной цитометрии. Процент клеток, положительных в отношении IL15, показан в Таблице 32.

Таблица 30: Количество Т-клеток

Дни в культуре	**HT**	**HT +IL15**	**OT-002019**	**OT-002019 +3 мкМ АЦЗ**	**OT-002019 +10 мкМ АЦЗ**	**OT-002090**	**OT-002094**	**OT-002094 +3 мкМ АЦЗ**	**OT-002094 +10 мкМ АЦЗ**
0	1,0E+06	1,0E+06	1,0E+06	1,0E+06	1,0E+06	1,0E+06	1,0E+06	1,0E+06	1,0E+06
3	8,1E+05	3,2E+06	2,0E+06	1,7E+06	1,7E+06	1,3E+06	6,3E+05	9,3E+05	8,7E+05
7	1,4E+05	5,4E+06	6,7E+06	5,7E+06	5,6E+06	4,1E+06	2,5E+05	1,8E+06	1,9E+06
10	3,0E+04	1,2E+07	2,1E+07	1,7E+07	1,6E+07	1,0E+07	2,3E+05	3,3E+06	3,6E+06

Таблица 31: Соотношение CD4/CD8

Дни в культуре	**HT**	**HT +IL15**	**OT-002090**	**OT-002019**	**OT-002019 +3 мкМ АЦЗ**	**OT-002019 +10 мкМ АЦЗ**	**OT-002094**	**OT-002094 +3 мкМ АЦЗ**	**OT-002094 +10 мкМ АЦЗ**
0	5,64	5,64	3,79	2,51	2,51	2,51	3,83	3,83	3,83
3	1,58	2,57	0,66	0,45	0,46	0,47	1,00	0,83	0,84
7	0,49	0,64	0,09	0,06	0,06	0,07	0,48	0,15	0,15

10	0,98	0,28	0,04	0,02	0,02	0,03	0,35	0,07	0,08

Таблица 32: Процент IL15-положительных клеток

Дни в культуре	**Нетрансдуцирован.**	**Нетрансдуцирован. +IL15**	**OT-002090**	**OT-002019**	**OT-002019 +3 мкМ АЦЗ**	**OT-002019 +10 мкМ АЦЗ**
0	0	0	30	75	75	75
3	0	1	40	82	82	82
7	0	0	38	84	84	85
10	0	1	16	76	78	79

[0714] Непрерывное применение ацетазоламида в культуре привело к 3,6-кратному размножению за 10 дней, а обработка ацетазоламидом снизила соотношение CD4/CD8.

Пример 6. Регуляция CD40L *in vitro* в Т-клетках

[0715] Конструкции CD40L, регулируемые ДД карбоангидразы, были получены и клонированы в лентивирусные векторы. Очищенные Т-клетки размораживали и культивировали с Dynabeads aCD3 aCD28 (в соотношении 3 шарика на 1-у Т-клетку).

[0716] Конструкции трансдуцировали в Т-клетки на следующий день. Через 48 часов после добавления вируса, лиганд-зависимую регуляцию тестировали с использованием 50 мкМ ацетазоламида или контроля (ДМСО). Через 24 часа после добавления лиганда Т-клетки окрашивали на экспрессию CD40L и анализировали с помощью FACS. В присутствии ацетазоламида OT-001990 демонстрировал увеличение экспрессии CD40L по сравнению с плацебо и Т-клетками, экспрессирующими пустой вектор без вставки. Экспрессию CD40L в ответ на увеличение дозы ацетазоламида измеряли в CD4+ и CD8+ Т-клетках. Клетки обрабатывали ацетазоламидом в течение 24 часов и измеряли экспрессию CD40L с помощью FACS. Результаты представлены в виде медианной интенсивности флуоресценции в Таблице 33 и в виде процента CD40L-положительных клеток в Таблице 34.

Таблица 33. СИФ CD40L

Ацетазоламид (мкМ)	**CD4+**	**CD8+**
0,01	112	105
0,05	123	104
0,2	185	136
0,8	481	307
3,1	840	380
12,5	2783	1599

50	3728	2184

Таблица 34. Процент CD40L-положительных клеток

Ацетазоламид (мкМ)	CD4+	CD8+
0,01	4,13	0,59
0,05	5,44	0,44
0,2	10,3	1,48
0,8	45,6	25,2
3,1	69,3	41,2
12,5	90,3	77,2
50	91,1	80,7

[0717] Как показано в Таблице 33 и Таблице 34, лиганд-зависимая регуляция наблюдалась как в CD4+ Т-клетках, так и в CD8+ Т-клетках. Однако абсолютные значения МИФ и процента CD40L-положительных клеток были выше у CD4+ клеток. Количество ацетазоламида, необходимое для достижения стабилизации CD40L, находится в пределах уровня лиганда, который может быть достигнут у человека.

Пример 7. Регуляция мембранносвязанного IL12-CA2 в первичных CAR-T-клетках человека

[0718] Т-клетки трансдуцировали бицистронной конструкцией (OT-002008), обеспечивающей экспрессию CD19-CAR и ДД CA2-регулируемую экспрессию мембраносвязанной формы IL12. Т-клетки активировали, трансдуцировали указанными конструкциями и размножали, как описано выше. Трансдуцированные клетки обрабатывали 100 мкМ ацетазоламида (или плацебо в качестве контроля) в течение 20 часов. Экспрессию поверхностного IL12 определяли с помощью антитела к IL12p70 (BD, Franklin Lakes, NJ). Обработка ацетазоламидом вызвала 6-кратное увеличение экспрессии поверхностного IL12 по сравнению с контролем носителем. Экспрессия IL12 клетками, экспрессирующими OT-002008, была выше, чем уровни IL12, наблюдаемые в Т-клетках, трансдуцированных только конструкцией CAR OT-001407.

[0719] В день 0 первичные Т-клетки человека стимулировали Dynabeads (T-expander CD3/CD28) в соотношении шарики:клетки, равным 3:1, в среде, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБЧ). На следующий день были добавлены лентивирусы, полученные с помощью конструкций, экспрессирующих CD19-CAR и мембраносвязанный гибкий IL12, OT-002007, OT-002008, OT-002010 и OT-002012, в присутствии сниженного содержания сыворотки (5% ФБЧ). На 2-й день клетки разводили 1:2 свежей средой с 10% ФБЧ. Клетки размножали в течение 10-11 дней, а затем замораживали в жидком азоте. Затем Т-клетки размораживали и подсчитывали. 1-2e5 клеток помещали в каждую лунку 96-луночного V-образного планшета, повторно стимулировали растворимым реагентом CD3/CD28 Immunocult (Stem Cell Technologies) и обрабатывали дозой ацетазоламида в диапазоне 0-100 мкМ. После инкубации в течение 24 часов экспрессию полезной нагрузки анализировали методом проточной цитометрии с использованием CD19-Fc для выявления экспрессии CAR на поверхности. Экспрессию поверхностного IL12 определяли с помощью антитела к IL12p70 (BD). Строили график геометрической СИФ поверхностной экспрессии IL12p70 на CAR+ клетках

(Таблица 35) и кривую зависимости доза-ответ аппроксимировали с помощью программного обеспечения Prism. Аппроксимация кривой зависимости доза-ответ показана на Фиг. 2.

Таблица 35. СИФ поверхностного IL12

Концентрация лиганда (мкМ)	**OT-002007**	**OT-002008**	**OT-002010**	**OT-002012**
100	7835	6432	9871	6616
33	5592	5222	7760	5061
11,1	4383	3869	5678	3822
3,7	4132	3281	5043	3070
1,2	3800	3315	4385	2894
0,41	3743	2778	4531	2778
0,14	3716	2919	4530	2734
0,046	3597	3018	4581	2934
0,015	3749	3099	4700	2814
0,001	3665	2971	4411	2858

[0720] Как показано в Таблице 35, OT-002010 продемонстрировал динамический доза-ответ на ацетазоламид с низкой экспрессией при самых низких концентрациях лиганда и значительной индукцией в присутствии лиганда. Эти данные показывают, что ДД CA2 способны регулировать мембраносвязанные полезные нагрузки IL12.

Пример 8. Зависимость регуляции CD40L от времени в Т-клетках *in vitro*

[0721] Конструкции CD40L, регулируемые ДД карбоангидразы, были получены и клонированы в лентивирусные векторы. Очищенные Т-клетки размораживали и культивировали с Dynabeads aCD3 aCD28 (в соотношении 3 шарика на 1-у Т-клетку).

[0722] Конструкции трансдуцировали в Т-клетки и вводили дозу 50 мкМ ацетазоламида или контроля (ДМСО) в течение 48 часов. Также оценивали контроль пустого вектора (ПВ) и конститутивного CD40L (OT-001661). Клетки фиксировали через 2, 4, 6, 8, 24 и 48 часов, затем Т-клетки окрашивали на экспрессию CD40L и анализировали с помощью FACS. Результаты представлены в виде медианной интенсивности флуоресценции в Таблице 36 и в виде процента CD40L-положительных клеток в Таблице 37.

Таблица 36. СИФ CD40L

Время (часы)	**ПВ**		**Конститутивный CD40L (OT-001661)**		**CA2-регулируемый CD40L (OT-001990) ДМСО**		CA2-регулируемый CD40L (OT-001990) 50 мкМ ацетазоламида	
	CD4+	**CD8+**	**CD4+**	**CD8+**	**CD4+**	**CD8+**	**CD4+**	**CD8+**
2	1030	482	4042	2212	406	305	620	351
4	1371	457	4651	2994	381	270	1731	540
6	1239	360	3156	1773	302	224	2410	742

24	1533	321	9491	3563	400	221	10982	2376
48	1282	283	5639	2313	396	210	10384	3050

Таблица 37. Процент CD40L-положительных клеток

Время (часы)	**ПВ**		**Конститутивный CD40L (OT-001661)**		**CA2-регулируемый CD40L (OT-001990) ДМСО**		CA2-регулируемый CD40L (OT-001990) 50 мкМ ацетазоламида	
	CD4+	**CD8+**	**CD4+**	**CD8+**	**CD4+**	**CD8+**	**CD4+**	**CD8+**
2	52	28,6	72,8	56,9	12,1	4,9	34,7	10,8
4	67,6	17,8	77	63,2	11,6	5,9	72,2	28
6	65	9,6	67,2	48,5	6,6	1	81,2	42,7
24	77,5	10,7	93,3	71,2	10,5	1,1	96,3	73,7
48	69,3	6,8	88,5	71,1	11,2	2,2	97,4	79,2

[0723] В присутствии ацетазоламида OT-001990 демонстрировал увеличение экспрессии CD40L по сравнению с плацебо и Т-клетками, экспрессирующими пустой вектор без вставки. Экспрессию CD40L в ответ на увеличение дозы ацетазоламида измеряли в CD4+ и CD8+ Т-клетках. Как показано в Таблице 36 и Таблице 37, лиганд-зависимая регуляция наблюдалась как в CD4+ Т-клетках, так и в CD8+ Т-клетках. Абсолютные значения СИФ и процент CD40L-положительных клеток были выше в CD4+ клетках. Экспрессия достигла своего пика через 24 часа, при этом самые высокие дозы экспрессировали более высокие уровни, чем конститутивные.

Пример 9. Регуляция CD40L в Т-клетках с помощью CA2

[0724] Для проверки регуляции активированные Т-клетки трансдуцировали лентивирусом CA2-регулируемым CD40L (OT-001990) и контролем CD40L (OT-001661). Через два дня клетки обрабатывали плацебо или 50 мМ лиганда в течение 24 ч, как описано в Таблице 38, после чего их анализировали на экспрессию на поверхности CD40L. Ниже показаны результаты для CD4+ и CD8+ клеток и общего количества клеток. В таблице «Ацз» - это ацетазоламид.

Таблица 38: Процент клеток, экспрессирующих CD40L

Конструкция (ДД)	**Лиганд**	**CD4+**		**CD8+**		**Все клетки**	
		CD40L-положительные	**СИФ**	**CD40L-положительные**	**СИФ**	**CD40L-положительные**	**СИФ**
OT-001661 (контроль CD40L)	н.д.	98,7%	24489	97,8%	14352	98%	20451
OT-001990 (CA2)	ДМСО	4,9%	112	0,1%	97,9	4%	110

OT-001990 (CA2)	50 мкМ Ацз	91,1%	3728	80,7%	2184	88,8%	3304

[0725] Регулируемая экспрессия с дестабилизирующими доменами значительно усилила экспрессию CD40L за пределы эндогенных уровней. Дестабилизирующие домены CA2 показывают уровни, близкие к конститутивной экспрессии, при дозах лиганда, близких к клинически значимым.

Пример 10. Титрование дозы лиганда

[0726] Для оценки CA2-регулируемой экспрессии CAR в ответ на ацетазоламид, Т-клетки размораживали и активировали в течение ночи в присутствии Dynabeads CD3/CD28 при соотношении шарики/клетки, равном 3:1. На следующий день клетки трансдуцировали указанными конструкциями или пустым вектором. Клетки размножали путем добавления свежей среды в течение 10 дней, поддерживая количество клеток около 0,5x10^6 клеток/мл. На 8-й день размножения аликвоту клеток высевали в 96-луночные планшеты и обрабатывали титром ацетазоламида, затем анализировали экспрессию CAR после 24-часовой инкубации путем окрашивания FACS с 10 мкг/мл CD19-Fc.

[0727] Как показано в Таблице 39, OT-002175, например, демонстрирует хорошие характеристики низкой исходной экспрессии CAR, с более чем 10-кратным увеличением регулируемой экспрессии при низкой (< 1 мкМ) концентрации лиганда.

Таблица 39. CA2-регулируемая экспрессия CAR в ответ на ацетазоламид (АЦЗ)

АЦЗ (мкМ)	OT-001988	OT-001989	OT-002173	OT-002174	OT-002175	OT-002176	OT-002177	OT-002178	OT-002179	OT-002180
0	13,9	14,6	23,9	19,8	3,49	3,27	10,1	1,56	15,1	10
0,015	12,6	17,1	26,3	19,9	4,6	4,2	13	2,18	17,3	
0,046	16,8	20,4	27,6	23,2	6,5	5,26	16,2	2,88	19,4	
0,137	15,9	28,5	32,7	20,7	13	7,78	20,4	7,05	22,5	
0,412	22,6	39,4	40	20,4	24,8	13,2	23,3	10,7	25,8	
1,235	39,9	47,5	44,4	20,3	33,9	21,5	25,1	12,3	27,9	
3,704	51,2	50,4	47,9	21,9	38,1	27,2	25,7	13,9	28,8	
11,111	55,1	52,2	48,8	22,3	39,6	29	26,2	13,9	28,6	29
33,333	56,2	51,2	49,1	26,2	40	30,4	26,4	14,3	28,7	
100	58	52,7	48,3	33,3	41,6	31,5	25,9	14,2	28,6	

[0728] Значения EC50, представленные в Таблице 40, были рассчитаны в Spotfire путем аппроксимации 4-параметрической кривой под % CAR+ клеток в гейте Синглет | живая клетка в отношении дозы лиганда.

Таблица 40. CA2-регулируемая экспрессия CAR в ответ на ацетазоламид - значения EC50

Конструкция	Мутант	EC50 (мкМ)
OT-001988	I59N G102R	0,98
OT-001989	L156H	0,23
OT-002173	G63D E69V N231I	0,27
OT-002174	L197P	>10
OT-002175	L156H S172C F178Y E186D	0,33
OT-002176	R27L T87I H122Y N252D	0,72
OT-002177	S56N	0,08
OT-002178	D72F V241F P249L	0,18
OT-002179	D71L T87N L250R	0,14
OT-002180	L183S	H/O

Пример 11. Подтверждение CA2-регулируемой экспрессии CAR и цитотоксичности в большой партии клеток в исследовании in vivo

[0729] Для подтверждения CA2-регулируемой экспрессии CAR в большой партии клеток для исследования in vivo, Т-клетки размораживали и активировали в течение ночи в присутствии Dynabeads CD3/CD28 в соотношении шарики/клетки, равном 3:1. На следующий день клетки трансдуцировали лентивирусом из конструкций pELDS-001, OT-001407 или OT-002175. Клетки размножали путем добавления свежей среды в течение 10 дней, поддерживая количество клеток около 0,5x10^6 клеток/мл, затем замораживали. Для проверки экспрессии CAR клетки размораживали и культивировали в течение ночи либо в среде для Т-клеток, либо с шариками CD3/CD28 (в соотношении шарики:клетки, равном 1:1), либо с цитокинами (10 нг/мл каждого из IL2, IL7, IL15 и IL21) в присутствии ДМСО или 10 мкМ ацетазоламида. Клетки анализировали на экспрессию CAR после 24-часовой инкубации путем FACS-окрашивания с 1 мкг/мл CD19-Fc, а % CAR+ клеток определяли с помощью гейта Синглет | живая клетка.

[0730] Как показано в Таблице 41, около 40-50 % клеток были CAR-положительными после культивирования размороженных клеток в течение ночи.

Таблица 41. Процент CAR+ клеток после размораживания в большой партии

	pELNS-001: ДМСО	OT-001407: ДМСО	OT-002175: ДМСО	OT-002175: АЦЗ 10 мкМ
Без шариков	1,01	42,8	3,17	17,8
Шарики CD3/28	1,61	52,2	31,6	42,8
Без цитокинов	0,091	41,1	0,91	18,3
Цитокины	0,12	37,2	4	39,6

[0731] Для подтверждения цитотоксичности в большой партии клеток для исследования in vivo, Т-клетки размораживали и активировали в течение ночи в присутствии Dynabeads CD3/CD28 в соотношении шарики/клетки, равном 3:1. На следующий день клетки трансдуцировали лентивирусом из конструкций

pELDS-001, OT-001407 или OT-002175. Клетки размножали путем добавления свежей среды в течение 10 дней, поддерживая количество клеток около 0,5x10^6 клеток/мл, затем замораживали. Для подтверждения цитотоксичности клетки размораживали и смешивали с клетками Nalm6-NucLightRed при соотношении эффектор:клетки-мишени (E:T), равном 10:1, 3:1, 1:1, 0,3:1, 0,1:1, 0,03:1 и обрабатывали либо 10 мкМ ацетазоламида, либо контролем (ДМСО) в течение 5 дней. Красные флуоресцентные изображения собирали и количественно оценивали каждые 2 часа с помощью Incucyte Zoom в качестве меры пролиферации опухолевых клеток Nalm6.

[0732] Результаты, показанные в Таблице 42, показывают, что в течение всего эксперимента, т.е. через 120 часов трансдуцированные вектором Т-клетки не подавляли пролиферацию Nalm6, но трансдуцированные конститутивным CAR OT-001407 (SEQ ID NO: 210963; кодируемые SEQ ID NO: 210964) Т-клетки ингибируют пролиферацию при культивировании в соотношении E:T, равном 10:1, 3:1 или 1:1. Т-клетки, трансдуцированные OT-002175, показывают уничтожение клеток Nalm6 в отсутствие лиганда при высоком соотношении E:T, равном 10:1, что свидетельствует об исходной активности, но увеличивает уничтожение в присутствии ацетазоламида.

Таблица 42. Цитотоксичность клеток после размораживания в большой партии

Соотношение E:T	pELNS-001: ДМСО	OT-001407: ДМСО	OT-002175: ДМСО	OT-002175: АЦЗ 10 мкМ
10:1	692374	5715	255406	42811
3:1	1010606	13781	720078	580132
1:1	1104630	341838	834657	887002

[0733] Через 72 часа собрали супернатанты из совместной культуры и анализировали на уровни ИФНг и IL-2 с помощью анализа MSD. Результаты, представленные в Таблице 43, показывают, что трансдуцированные вектором Т-клетки не секретировали ИФНг или IL-2, но трансдуцированные конститутивным CAR OT-001407 Т-клетки делали это в зависимости от клеточной дозы. Трансдуцированные Т-клетки OT-002175 демонстрируют регулируемую секрецию цитокинов в соотношении 10:1 и 3:1 в присутствии лиганда.

Таблица 43. Уровни ИФН-г и IL-2 соответствуют продолжительности и уровню цитотоксичности

	pELNS-001: ДМСО	OT-001407: ДМСО	OT-002175: ДМСО	OT-002175: АЦЗ 10 мкМ
10:1 ИФН-г	0	56251	473	9338
3:1 ИФН-г	0	33337	30	1096
10:1 IL-2	0,3	243	46	530
3:1 IL-2	0,1	5501	10	295

<u>Пример 12. Эффективность, фармакодинамика и фармакокинетика in vivo CA2-регулируемого CD19 CAR</u>

[0734] После многообещающих результатов, полученных in vitro с помощью OT-002175, эффективность, фармакодинамика и фармакокинетика этой конструкции были проверены in vivo в модели

ксенотрансплантата Nalm6-luc на восьминедельных самках мышей NSG. Схема эксперимента представлена в Таблице 44.

Таблица 44. Экспериментальная схема анализа OT-002175 in vivo

Группа	Кол-во	Конструкция	Обработка in vivo	Режим введения доз	Клеточная доза
1A, 1B	8	pELDS-001-013	Контроль	1 р/сут	5M
2A, 2B	8	OT-001407	Контроль	1 р/сут	5M
3A, 3B	8	OT-001407	Ацетазоламид	200 мг/кг 1 р/сут	5M
4A, 4B	8	OT-002175	Контроль	1 р/сут	5M
5A, 5B	8	OT-002175	Ацетазоламид	200 мг/кг 1 р/сут	5M
6A, 6B	8	OT-002175	Ацетазоламид	100 мг/кг 1 р/сут	5M
7A, 7B	8	OT-002175	Ацетазоламид	30 мг/кг 1 р/сут	5M
1C	4	pELNS-001	Контроль	1 р/сут	5M
2C	4	OT-001407	Контроль	1 р/сут	5M
4C	4	OT-002175	Контроль	1 р/сут	5M
5C	4	OT-002175	Ацетазоламид	200 мг/кг 1 р/сут	5M

[0735] Однократные и повторные пероральные дозы ацетазоламида в дозе 200 мг/кг вводили в носителе (10% ДМСО; 20% Коллифор RH40; 30% ПЭГ 400; 40% (12%) каптизол в воде). Концентрация в плазме ацетазоламида измеряли в течение 24 часов после однократной дозы, а после повторных ежедневных доз - в течение 100 часов (данные не показаны). Вес тела измеряли в течение 12 дней после ежедневных повторных доз в дни 0-4 и 8-11 (данные не показаны). Многодозовая парадигма показала, что повторные дозы ацетазоламида не повышают ежедневные значения Cmax в течение 1 часа, а изменения массы тела от дозирования начинают выравниваться к концу первой недели приема ежедневных доз, что позволяет предположить, что животные, получающие многократные дозы ацетазоламида, смогут переносить длительное повторное введение доз.

[0736] Ответ на дозу OT-002175 проверяли путем измерения общего потока у мышей, получавших повторные дозы лиганда в течение 32 дней после имплантации опухоли (данные не показаны). Концентрации 30 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг ацетазоламида показали соответственно возрастающую противоопухолевую активность при сопоставимом воздействии на массу тела.

[0737] Эти результаты показывают, что первоначальное воздействие дозирования ацетазоламида на массу тела преодолевается начиная со второй недели дозирования, что свидетельствует о хорошей долгосрочной переносимости лиганда и поддержании высокой экспрессии CAR. При использовании OT-002175 была достигнута дозозависимая противоопухолевая эффективность.

[0738] Проводился мониторинг CA2-регулируемой экспрессии CAR в цельной крови после инфузии CAR-T клеток. Количество человеческих T-клеток в 50 мкл крови подсчитывали через 7 дней после инфузии и обнаружили, что оно ниже, чем количество клеток, наблюдаемое в контролях, экспрессирующих конститутивно экспрессирующийся CD19 CAR, но все еще регулируемый обработкой ацетазоламидом

(данные не показаны). CD19 OT-002175 CAR-T-клетки собирали и оценивали на экспрессию CD69 и CD25, и было обнаружено, что они смещены в сторону активированного фенотипа CD8 + (данные не показаны).

[0739] Эти результаты демонстрируют, что CA2-регулируемые CAR проявляют противоопухолевую активность, согласующуюся с экспериментами по эффективности, а обработка ацетазоламидом позволяет осуществлять CAR-опосредованное размножение Т-клеток и регулировать экспрессию CAR в крови при дозировке ацетазоламида на клинически достижимых уровнях и с отклонением CAR CD19 в сторону фенотипа CD8 +.

[0740] Конечный сбор выполняли для оценки статуса антигена CD19 Nalm6 в костном мозге и метастазов, чтобы определить, может ли потеря антигена объяснять сниженную регулируемую эффективность CD19 OT-002175 CAR-T клеток по сравнению с конститутивным контролем CAR. Экспрессия CD19 наблюдалась в образцах опухоли и костного мозга, и никаких признаков потери антигена не наблюдалось (данные не показаны).

Пример 13. Характеристика отдельных мутаций и комбинаций мутаций, выявленных в ходе скрининга и структурно-направленных мутаций

[0741] ДД CA2 конструировали с индивидуальными или парными точечными мутациями, полученными из мутантов, идентифицированных в ходе скрининга. Кроме того, также разработали ДД CA2 с рационально сконструированными новыми мутациями. Созданные таким образом ДД CA2 были связаны с AcGFP и клонированы в лентивирусные векторы. Клетки Jurkat трансдуцировали лентивирусом, обрабатывали ацетазоламидом в течение 24 часов и анализировали экспрессию GFP с помощью FACS.

[0742] В Таблицах 45-51 приведена характеристика различных мутантов ДД CA2.

Таблица 45: Характеристика ДД CA2

Конструкция	DRD	Исходный	Макс.	[АЦЗ], мкМ	Кратное изменение	EC50, мкМ
OT-CA2-058	CA2 (G63D, M240L)	171	1346	30	7,9	0,54
OT-CA2-059	CA2 (A77I, P249F)	124	1208	30	9,8	1,1
OT-CA2-060	CA2 (D71K, T192F)	234	1352	30	5,8	0,14

Таблица 46: Характеристика ДД CA2

Конструкция	DRD	Исходный	Макс.	[АЦЗ], мкМ	Кратное изменение	EC50, мкМ
OT-CA2-085	CA2 (Y51T)	19078	54252	30	2,8	0,15
OT-CA2-086	CA2 (S73N, R89F)	16867	48989	30	2,9	0,07

OT-CA2-087	CA2 (D72F, P249F)	11516	60576	30	5,3	0,11
OT-CA2-088	CA2 (T55K, G63N, Q248N)	7266	82304	30	11,3	0,73
OT-CA2-089	CA2 (Y193I)	9777	58225	30	6	0,25
OT-CA2-090	CA2 (S56F)	8070	87425	30	10,8	0,77
OT-CA2-091	CA2 (S56F, D71S)	3395	67527	30	19,9	1,6
OT-CA2-092	CA2 (S73N, R89Y)	23056	75755	30	3,3	0,07
OT-CA2-093	CA2 (V134F, L228F)	26215	50435	30	1,9	0,02

Таблица 47: Характеристика ДД CA2

Конструкция	**DRD**	**Исходный**	**Макс.**	**[АЦЗ], мкМ**	**Кратное изменение**
OT-CA2-096	CA2 (L156H, делеция 4-х аминокилс. На C-конце)	30,85	217,6	30	7,1
OT-CA2-097	CA2 (L156H, делеция 4-х аминокилс. на N-конце)	40,5	131,6	30	3,2
OT-CA2-098	CA2 (W4Y, L156H)	39	533,1	30	13,7
OT-CA2-099	CA2 (L156H, GEP делеция петли P2)	27,7	356,6	30	12,9
OT-CA2-101	CA2 (L156H, F225L)	67,1	960,6	30	14,3
OT-CA2-102	CA2 (D70N, D74N, D100N, L156H)	38,05	180,6	30	4,7

Таблица 48: Характеристика ДД CA2

Конструкция	**DRD**	**Исходный**	**Макс.**	**[АЦЗ], мкМ**	**Кратное изменение**
OT-CA2-073	CA2 (R27L, H122Y)	173,5	725	30	4,2
OT-CA2-075	CA2 (T87I, H122Y)	493,5	1277,5	30	2,6
OT-CA2-077	CA2 (H122Y, N252D)	318,5	1091,5	30	3,4

OT-CA2-078	CA2 (D72F, V241F)	395	1569,5	30	4
OT-CA2-079	CA2 (V241F, P249L)	1376	2262,5	30	1,6
OT-CA2-080	CA2 (D72F, P249L)	578	1563,5	30	2,7
OT-CA2-081	CA2 (D71L, T87N)	1567,5	2372,5	30	1,5
OT-CA2-082	CA2 (D71L, L250R)	454	1674	30	3,7

Таблица 49: Характеристика ДД CA2

Конструкция	DRD	Исходный	Макс.	[АЦЗ], мкМ	Кратное изменение
OT-CA2-006	CA2 (E106D)	98943	268996	50	2,8

Таблица 50: Характеристика ДД CA2

Конструкция	DRD	Исходный	Макс.	[АЦЗ], мкМ	Кратное изменение
OT-CA2-038	CA2 (I59N)	76,6	1156,6	30	15,1
OT-CA2-039	CA2 (G63D)	644,1	2086,6	30	3,2
OT-CA2-046	CA2 (H122Y)	237,8	220,8	30	0,9

Таблица 51: Характеристика ДД CA2

Конструкция	DRD	Исходный	Макс.	[АЦЗ], мкМ	Кратное изменение
OT-CA2-031	CA2 (L197P)	660	1753	30	2,7
OT-CA2-032	CA2 (L156H, S172C, F178Y, E186D)	483	12826	30	26,6
OT-CA2-033	CA2 (L156H)	683	17726	30	26
OT-CA2-034	CA2 (R27L, T87I, H122Y, N252D)	306	10826	30	35,4

[0743] В Таблице 52 и на Фиг. 3 представлены результаты доза-ответ для OT-002347 и OT-001978.

Таблица 52: Доза-ответ ДД CA2

[АЦЗ], мкМ	OT-002347	OT-001978
30	87667,5	28337,5
10	81749	25959,83
3,3	75551,67	24250,17
1,1	65318,33	20978,83
0,36	48149,33	15438,67
0,12	29860,33	9858,5
0,04	21283,67	6473,5
0,0133	18682,67	5499,333
0,004433	16782,17	5327,167
0	16539,67	5077,667
EC50, мкМ	0,4796	0,4589

[0744] Хотя настоящее изобретение было описано достаточно подробно и с некоторыми особенностями в отношении нескольких описанных вариантов осуществления, не предполагается, что оно должно быть ограничено какими-либо такими особенностями или вариантами осуществления или каким-либо конкретным вариантом осуществления, но оно должно быть истолковано со ссылками на прилагаемую формулу изобретения таким образом, чтобы обеспечить максимально широкое толкование такой формулы с учетом уровня техники и, следовательно, эффективно охватить предполагаемый объем изобретения.

[0745] Все публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки, упомянутые в настоящем документе, включены в него путем ссылки в полном объеме. В случае противоречия, настоящее описание, включая определения, будет приоритетным. Кроме того, заголовки разделов, материалы, методы и примеры носят исключительно иллюстративный характер и не являются ограничивающими.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая эффекторный модуль, причем указанный эффекторный модуль содержит элемент ответа на стимул (SRE — англ.: stimulus response element) и по меньшей мере одну полезную нагрузку, функционально связанную с указанным SRE, при этом SRE включает дестабилизирующий домен (ДД), причем указанный ДД содержит целую карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717) или ее область, и дополнительно содержит мутацию H122Y в аминокислоте в положении 122 (H122) SEQ ID NO: 11717.

2. Композиция по п. 1, в которой ДД дополнительно содержит:
(i) мутацию R27L в аминокислоте в положении 27 (R27) SEQ ID NO: 11717;
(ii) мутацию T87I в аминокислоте в положении 87 (T87) SEQ ID NO: 11717;
(iii) мутацию N252D в аминокислоте в положении 252 (N252) SEQ ID NO: 11717; или
(iv) комбинацию (i), (ii) и/или (iii).

3. Композиция, содержащая эффекторный модуль, причем указанный эффекторный модуль содержит элемент ответа на стимул (SRE — англ.: stimulus response element) и по меньшей мере одну полезную нагрузку, функционально связанную с указанным SRE, при этом SRE включает дестабилизирующий домен (ДД), причем указанный ДД содержит целую карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717) или ее область, и дополнительно содержит мутацию E106D в аминокислоте в положении 106 (E106) SEQ ID NO: 11717.

4. Композиция, содержащая эффекторный модуль, причем указанный эффекторный модуль содержит элемент ответа на стимул (SRE — англ.: stimulus response element) и по меньшей мере одну полезную нагрузку, функционально связанную с указанным SRE, при этом SRE включает дестабилизирующий домен (ДД), причем указанный ДД содержит целую карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717) или ее область, и дополнительно содержит мутацию W208S в аминокислоте в положении 208 (W208) SEQ ID NO: 11717.

5. Композиция по п. 3 или п. 4, в которой ДД дополнительно содержит мутацию C205S в аминокислоте в положении 205 (C205) SEQ ID NO: 11717.

6. Композиция, содержащая эффекторный модуль, причем указанный эффекторный модуль содержит элемент ответа на стимул (SRE — англ.: stimulus response element) и по меньшей мере одну полезную нагрузку, функционально связанную с указанным SRE, при этом SRE включает дестабилизирующий домен (ДД), причем указанный ДД содержит целую карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717) или ее область, и дополнительно содержит мутацию I59N в аминокислоте в положении 59 (I59) SEQ ID NO: 11717.

7. Композиция по п. 6, в которой ДД дополнительно содержит мутацию G102R в аминокислоте в положении 102 (G102) SEQ ID NO: 11717.

8. Композиция, содержащая эффекторный модуль, причем указанный эффекторный модуль содержит элемент ответа на стимул (SRE — англ.: stimulus response element) и по меньшей мере одну полезную нагрузку,

функционально связанную с указанным SRE, при этом SRE включает дестабилизирующий домен (ДД), причем указанный ДД содержит целую карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717) или ее область, и дополнительно содержит мутацию L156H в аминокислоте в положении 156 (L156) SEQ ID NO: 11717.

9. Композиция по п. 8, в которой ДД дополнительно содержит:

(i) мутацию W4Y в аминокислоте в положении 4 (W4) SEQ ID NO: 11717;

(ii) мутацию F225L в аминокислоте в положении 225 (F225) SEQ ID NO: 11717;

(iii) делецию аминокислот в положениях 257-260 SEQ ID NO: 11717;

(iv) делецию аминокислот в положениях 1-5 SEQ ID NO: 11717; или

(v) делецию аминокислот G234, E235 и P236 SEQ ID NO: 11717.

10. Композиция по п. 8, в которой ДД содержит четыре мутации по сравнению с SEQ ID NO: 11717, причем указанные мутации соответствуют:

(i) L156H, S172C, F178Y и E186D; или

(ii) D70N, D74N, D100N и L156H.

11. Композиция, содержащая эффекторный модуль, причем указанный эффекторный модуль содержит элемент ответа на стимул (SRE — англ.: stimulus response element) и по меньшей мере одну полезную нагрузку, функционально связанную с указанным SRE, при этом SRE включает дестабилизирующий домен (ДД), причем указанный ДД содержит целую карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717) или ее область, и дополнительно содержит первую мутацию и вторую мутацию по сравнению с SEQ ID NO: 11717, при этом:

(i) первая мутация представляет собой мутацию S73N в аминокислоте в положении 73 (S73) SEQ ID NO: 11717; и

(ii) вторая мутация представляет собой замену F или Y в аминокислотном положении 89 (R89) SEQ ID NO: 11717.

12. Композиция, содержащая эффекторный модуль, причем указанный эффекторный модуль содержит элемент ответа на стимул (SRE) и по меньшей мере одну полезную нагрузку, функционально связанную с указанным SRE, при этом SRE включает дестабилизирующий домен (ДД), причем указанный ДД содержит целую карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717) или ее область, и дополнительно содержит замену N или F в аминокислотном положении 56 (S56) SEQ ID NO: 11717.

13. Композиция по п. 12, в которой ДД содержит две замены по сравнению с SEQ ID NO: 11717, которые соответствуют S56F и D71S.

14. Композиция, содержащая эффекторный модуль, причем указанный эффекторный модуль содержит элемент ответа на стимул (SRE — англ.: stimulus response element) и по меньшей мере одну полезную нагрузку, функционально связанную с указанным SRE, при этом SRE включает дестабилизирующий домен (ДД), причем указанный ДД содержит целую карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717) или ее область, и дополнительно содержит одну или более замен по сравнению с SEQ ID NO: 11717, при этом по меньшей

мере одна замена представляет собой замену D или N в аминокислотном положении 63 (G63) SEQ ID NO: 11717, и при этом одна или более замен соответствуют:

G63D;

G63D и M240L;

G63D, E69V и N231I; или

T55K, G63N и Q248N.

15. Композиция, содержащая эффекторный модуль, причем указанный эффекторный модуль содержит элемент ответа на стимул (SRE — англ.: stimulus response element) и по меньшей мере одну полезную нагрузку, функционально связанную с указанным SRE, при этом SRE включает дестабилизирующий домен (ДД), причем указанный ДД содержит целую карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717) или ее область, и дополнительно содержит две или более замен по сравнению с SEQ ID NO: 11717, при этом одна из двух или более замен представляет собой замену L или K в аминокислотном положении 71 (D71) SEQ ID NO: 11717, и при этом указанные две или более замен соответствуют:

D71L и T87N;

D71L и L250R;

D71L, T87N и L250R; или

D71K и T192F.

16. Композиция, содержащая эффекторный модуль, причем указанный эффекторный модуль содержит элемент ответа на стимул (SRE — англ.: stimulus response element) и по меньшей мере одну полезную нагрузку, функционально связанную с указанным SRE, при этом SRE включает дестабилизирующий домен (ДД), причем указанный ДД содержит целую карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717) или ее область, и дополнительно содержит две или более замен по сравнению с SEQ ID NO: 11717, при этом по меньшей мере одна из двух или более замен представляет собой:

(i) замену F в аминокислотном положении 241 (V241) SEQ ID NO: 11717; или

(ii) замену F или L в аминокислотном положении 249 (P249) SEQ ID NO: 11717; и

при этом две или более замен соответствуют:

D72F и V241F;

D72F и P249L;

D72F и P249F;

D72F, V241F и P249L;

A77I и P249F; или

V241F и P249L.

17. Композиция, содержащая эффекторный модуль, причем указанный эффекторный модуль содержит элемент ответа на стимул (SRE — англ.: stimulus response element) и по меньшей мере одну полезную нагрузку, функционально связанную с указанным SRE, при этом SRE включает дестабилизирующий домен (ДД), причем указанный ДД содержит целую карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO: 11717) или ее область,

и дополнительно содержит одну или более замен по сравнению с SEQ ID NO: 11717, выбранных из Y51T, L183S, Y193I, L197P и комбинации V134F и L228F.

18. Композиция по любому из пп. 1-17, в которой ДД получен из области CA2, причем указанная область содержит аминокислоты 2-260 CA2 (SEQ ID NO: 210492).

19. Композиция по любому из пп. 1-18, в которой SRE реагирует на один или более стимулов.

20. Композиция по п. 19, в которой стимул представляет собой низкомолекулярное соединение, при этом низкомолекулярное соединение выбрано из ацетазоламида, целекоксиба, вальдекоксиба, рофекоксиба, метазоламида, дорзоламида, бринзоламида, диклофенамида, этоксзоламида, зонисамида, дансиламида или дихлорфенамида.

21. Композиция по любому из пп. 1-20, в которой по меньшей мере одна мутация или замена в ДД дестабилизирует ДД и по меньшей мере одну полезную нагрузку в отсутствие стимула, и при этом ДД и полезная нагрузка стабилизируются в присутствии стимула.

22. Композиция по любому из пп. 1-21, в которой по меньшей мере одна полезная нагрузка представляет собой терапевтический агент, природный белок, слитый полипептид, антитело или их вариант или фрагмент.

23. Композиция по любому из пп. 1-22, где композиция представляет собой один или более полипептидов.

24. Композиция по п. 22, в которой терапевтический агент представляет собой CD19 CAR.

25. Система биоцикла, содержащая композицию по любому из пп. 1-24.

26. Фармацевтическая композиция, содержащая композицию по любому из пп. 1-24 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

27. Полинуклеотид, кодирующий композицию по любому из пп. 1-24.

28. Фармацевтическая композиция, содержащая полинуклеотид по п. 27 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

29. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 27.

30. Клетка, содержащая полинуклеотид по п. 27.

31. Клетка по п. 30, в которой указанная клетка является иммунной клеткой для адоптивного переноса клеток (ACT).

32. Фармацевтическая композиция, содержащая клетку по п. 30 или п. 31 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

33. Способ получения модифицированной клетки, включающий введение в клетку молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей полинуклеотид по п. 27.

34. Способ модуляции экспрессии, функции и/или уровня полезной нагрузки в клетке по п. 30, причем указанный способ включает введение в клетку стимула, при этом SRE отвечает на стимул, а экспрессия, функция и/или уровень полезной нагрузки модулируются в ответ на стимул.

35. Способ лечения заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, причем указанный способ включает:

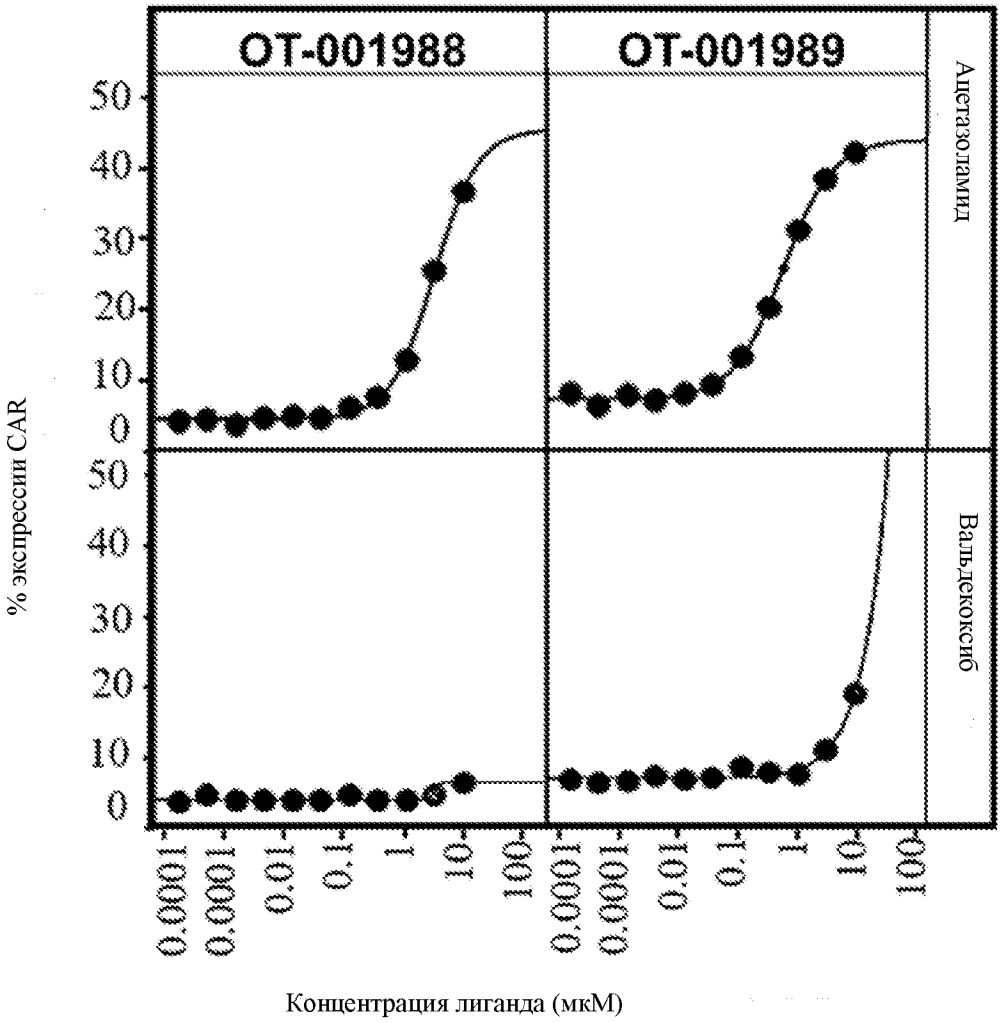
(a) введение субъекту терапевтически эффективного количества клетки по п. 30, при этом клетка содержит полезную нагрузку, которая лечит заболевание; и

(b) введение субъекту терапевтически эффективного количества стимула,

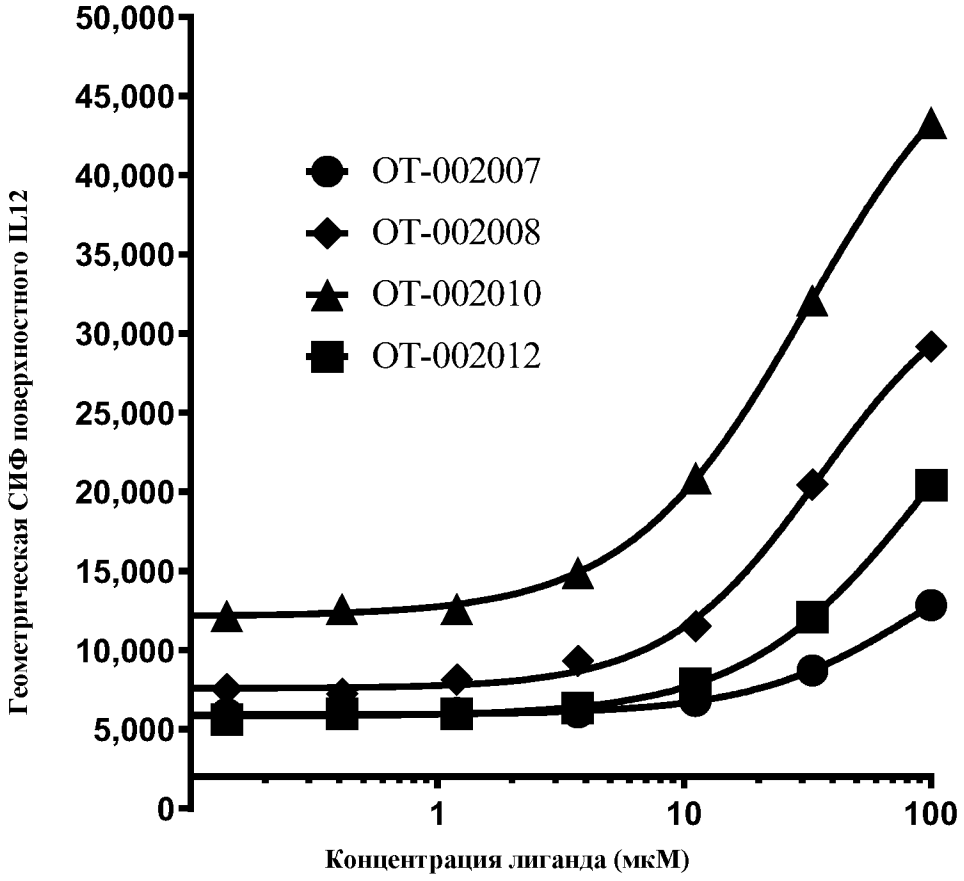
при этом SRE отвечает на стимул, а экспрессия полезной нагрузки модулируется в ответ на стимул для лечения таким образом заболевания.

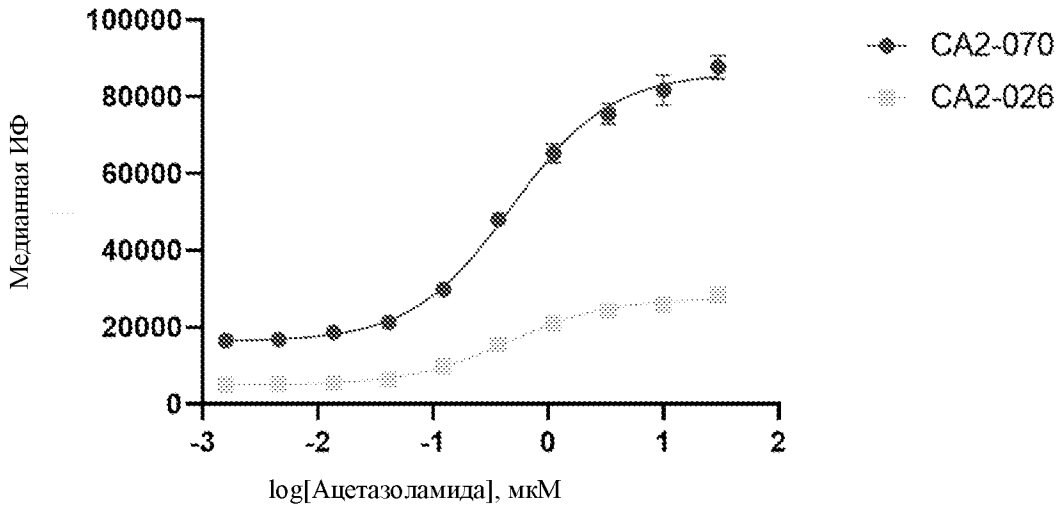
36. Способ по любому из пп. 34 или 35, в котором стимул выбран из ацетазоламида, целекоксиба, вальдекоксиба, рофекоксиба, метазоламида, дорзоламида, бринзоламида, диклофенамида, этоксзоламида, зонисамида, дансиламида или дихлорфенамида.

ФИГ. 1


OT-001988
OT-001989
Ацетазоламид
Вальдекоксиб
% экспрессии CAR
50
40
30
20
10
0
0,0001
0,0001
0,01
0,1
1
10
100
Концентрация лиганда (мкМ)

ФИГ. 2


50,000
45,000
40,000
35,000
30,000
25,000
20,000
15,000
10,000
5,000
0
1
10
100
OT-002007
OT-002008
OT-002010
OT-002012
Геометрическая СИФ поверхностного IL12
Концентрация лиганда (мкМ)

ФИГ. 3

Зависимость доза-ответ для ацетазоламида